

# Antikörper-selektive Polymere zur Reinigung von medizinischem Immunglobulin G

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Patricia Latza**

aus Essen

Fakultät für Chemie der  
Universität Duisburg-Essen

Essen, 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Eckart Hasselbrink

Tag der Disputation: 13.09.2013

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader in der Zeit von Oktober 2009 bis April 2013 an der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Ich erkläre hiermit des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderwärtig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Essen, im Juli 2013

.....

Patricia Latza

## *Danksagung*

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader für die Bereitstellung des überaus interessanten und herausfordernden Promotionsthemas, für sein fundiertes, umfassendes Fachwissen, für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und vor allem für sein Vertrauen und die mir eingeräumte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Mathias Ulbricht danke ich für die Übernahme des Koreferats, sowie für die zahlreichen fachlichen Gespräche und die konstruktive Kritik während des AbCap-Projekts.

Herrn Prof. Dr. Eckart Hasselbrink danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die finanzielle Unterstützung meines Themas bedanke ich mich bei dem BMBF – dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Meinen Kooperationspartnern des AbCap-Projekts danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit und den regen Informationsaustausch während der unzähligen Meetings. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Börje Sellergren für die Koordination des Projekts und für seine unverwechselbare Art immer genau die richtigen Fragen zum richtigen Zeitpunkt zu stellen. Ich danke außerdem Dr. Achim Schwämmle, Dr. Dirk Lütkemeyer, Dr. Jörg Stute und Dr. Norbert Jakubowski, die mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren Erfahrungen mir immer tatkräftig zur Seite standen.

Sebastian Schwark, Rajko Winkler und Patrick Lindemann danke ich für ihre Kooperation und ihre vielen wertvollen Ideen, die mir immer wieder den nötigen Anschwung gegeben haben.

Dr. Torsten Schaller und Heinz Bandmann danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme der NMR-Spektren und ihre Hilfe bei allen spektroskopischen und computertechnischen Fragen.



Heike Wöll möchte ich für die Messung der GPC-Spektren und der Durchführung der Peptidsynthesen danken.

Klaus Kowski danke ich recht herzlich für seine Unterstützung bei der Lösung aller technischen Problemen.

Ingeborg Reiter und ganz besonders Jessica Kunter danke ich für die überaus große Hilfe bei bürokratischen Problemen.

Patrick Gilles danke ich für die angenehme Laboratmosphäre, sowie für seine hilfreiche Unterstützung bei Lösungsmittelproblemen der besonderen Art.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Patrick Gilles, Constanze Wilch, Philipp Holz, und – ohne eure Hilfe wäre ich verzweifelt.

Allen Mitarbeitern der 5. Etage möchte ich für die sehr herzliche und inspirierende Arbeitsatmosphäre und für die unverwechselbare Bereitschaft, bei Problemen zu helfen, danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinem „Otter“, die mich auch in angespannter und gestresster Laune ertrugen und für ihre Unterstützung und Geduld während meiner Promotion und des gesamten Studiums.



Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

P.Latza, T.Schrader, *Affinity Polymers for IgG Recognition*, Poster im Rahmen des GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2011 „Chemie schafft Zukunft“, Bremen, 04. - 07. September 2011.

P.Latza, T.Schrader, *Affinity Polymers for IgG Recognition in Solution*, Poster im Rahmen des Forschungstags der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg Essen 2011, Essen, 25. November 2011.

P.Latza, T.Schrader, *Selectiv IgG Recognition by Affinity Polymers*, Poster im Rahmen OC2 Symposium of the Collaborative Research FOR618 „Aggregation of Small Molecules – from Dimer to Crystals“, Bochum, 29. – 31. Mai 2012.

P.Latza, T.Schrader, Abschlussbericht des BMBF-Projekts “Antikörper-Selektive Materialien zum Downstream Processing: Selektivität durch Wirt-Gast Chemie”, 2013.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	- 1 -
1.1	Antikörper und ihre Funktionen	- 4 -
1.2	Immunglobulinklassen	- 8 -
1.3	Immunglobulin G, Aufbau und Funktion	- 11 -
1.4	Monoklonale ABs und ihre medizinische Relevanz	- 17 -
1.5	Downstream Processing	- 20 -
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	- 22 -
<b>3</b>	<b>Durchführung und Ergebnisse</b>	- 25 -
3.1	Polymer-Design	- 25 -
3.1.1	Protein A/IgG-Interface	- 26 -
3.1.2	Epito-spezifische Monomere	- 31 -
3.1.3	Protein A-mimetisches Monomer	- 35 -
3.2	Optimierung der Polymerisationsbedingungen	- 44 -
3.3	Polymer Screening	- 49 -
3.4	Polymer-Immobilisierung	- 65 -
3.5	Proteinselektivität	- 71 -
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	- 75 -
4.1	Neue Monomere für das Protein A-Bindungsepitop	- 75 -
4.2	Parallele Mikro- und Mini-Polymerisation	- 77 -
4.3	Screening	- 78 -
4.4	Selektivität	- 82 -
4.5	Ausblick	- 82 -
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	- 85 -
5.1	Materialien und Methoden	- 85 -
5.1.1	Chemikalien	- 85 -

5.1.2	Lösungsmittel .....	- 85 -
5.1.3	Gefriertrocknung .....	- 85 -
5.1.4	Chromatographische Methoden .....	- 85 -
5.1.5	Spektroskopische Methoden .....	- 86 -
5.1.6	Verwendete Puffer .....	- 87 -
5.2	Synthese der Monomer-Bausteine .....	- 89 -
5.2.1	tert-Butyl-2-aminoethylcarbamate .....	- 89 -
5.2.2	tert-Butyl-2-methacrylamidoethylcarbamate .....	- 90 -
5.2.3	N-(2-aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid .....	- 91 -
5.2.4	N-Boc-Guanidin .....	- 93 -
5.2.5	Trichloracetylpyrrol .....	- 94 -
5.2.6	1H-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester .....	- 95 -
5.2.7	Formylpyrrolcarbonsäurebenzylester .....	- 97 -
5.2.8	1H-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester .....	- 100 -
5.2.9	1H-Pyrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester .....	- 102 -
5.2.10	1H-Pyrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure .....	- 103 -
5.2.11	1H-Pyrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure- [2-(2-methacryloylamino)-ethyl]amid .....	- 105 -
5.2.12	1H-Pyrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure- [2-(2-methylacryloylamino)ethyl]amid .....	- 107 -
5.2.13	N-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat .....	- 109 -
5.2.14	6-tert-Butoxycarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure- methylester .....	- 111 -
5.2.15	6-Amino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäuremethylester .....	- 112 -
5.2.16	(S)-methyl-2-methacrylamido-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3- dihydrobenzofuran-6-ylsulfonyl)guanidino)pentanoat .....	- 114 -
5.2.17	Methyl-5-guanidino-2-methacrylamidopentanoat .....	- 116 -
5.2.18	Methyl-2-(tert-butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexanoat .....	- 118 -
5.2.19	2-(tert-Butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexansäure .....	- 119 -
5.2.20	3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol .....	- 121 -
5.2.21	3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin .....	- 123 -
5.2.22	N-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid .....	- 124 -
5.2.23	Dilithium-N-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacryl- säureamid .....	- 126 -
5.2.24	N <sup>ε</sup> -Benzyloxycarbonyl-N <sup>α</sup> -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)- L-lysinmethylester .....	- 128 -

5.2.25	N <sup>α</sup> -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester .....	- 130 -
5.2.26	N <sup>ε</sup> -(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N <sup>α</sup> -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)- L-lysinmethylester .....	- 131 -
5.2.27	N <sup>ε</sup> -(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N <sup>α</sup> -bis(carboxymethyl)-L-lysin .....	- 133 -
5.2.28	N-2-Glucosylmethacrylamid.....	- 135 -
5.2.29	6-o-(p-Tolylsulfonyl)-β-cyclodextrin.....	- 137 -
5.2.30	6-Deoxy-6-N-(2-aminoethylamino)-β-cyclodextrin .....	- 138 -
5.2.31	6-Deoxy-6-N-(2-methacrylamidyl)ethylamino)-β-cyclodextrin .....	- 140 -
5.2.32	2-Anilino-4,6-dichloro-s-triazin .....	- 142 -
5.2.33	2-Anilino-4-chloro-6-tyramino-s-triazin.....	- 143 -
5.2.34	2-(2-Aminoethylamino)-4-anilino-6-tyramino-s-triazin .....	- 145 -
5.2.35	N-(2-(4-(4hydroxyphenylamino)-6-(phenylamino)-1,3,5-triazin-2- ylamino)ethyl)methacrylamid .....	- 147 -
5.2.36	N'-(5-N,N-dimethylaminonaphtylsulfonylamido)ethylamine .....	- 150 -
5.2.37	N-(2-(5-(dimethylamino)naphtalen-1-sulfonamido)ethyl)- methacrylamid .....	- 151 -
5.2.38	2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäuremethylester.....	- 153 -
5.2.39	2-(2-Methylacryloylamino)propionsäuremethylester.....	- 155 -
5.2.40	Dodecylmethacrylamid .....	- 157 -
5.3	Synthese der Polymere .....	- 160 -
5.3.1	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Polymere .....	- 160 -
5.3.2	Charakterisierung der dargestellten Polymere .....	- 161 -
5.4	Immobilisierung, Capture, Elution .....	- 214 -
5.4.1	Allgemeine Vorschrift zur Kupplung mit EDC und Sulfo-NHS.....	- 214 -
5.4.2	Vorschrift zum Capture- und Elution-Schritt für Anti-IL8.....	- 217 -
5.5	Enzym-linked Immunosorbent Assay.....	- 219 -
5.6	Fluoreszenztitrationen.....	- 230 -
5.7	NMR-Titration .....	- 242 -
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>- 245 -</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>- 249 -</b>





## 1 Einleitung

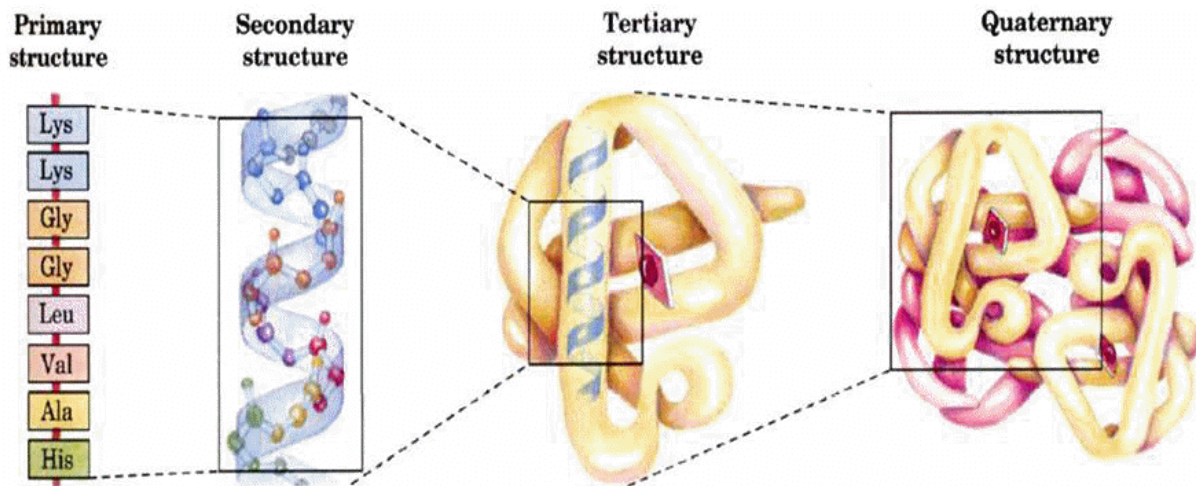
Proteine, als Grundstoff des Lebens bezeichnet, sind aus Aminosäuren aufgebaute biologische Makromoleküle mit äußerst komplexer Struktur. Proteine finden sich in allen Zellen und verleihen ihnen nicht nur als Strukturproteine, wie z.B. Kollagen, ihre Struktur, sondern bilden vielmehr die generelle mikrobiologische Basis des gesamten Lebens. So treten Proteine in der Natur in unterschiedlichsten Formen auf. Als Enzyme und Peptidhormone sind Proteine für den geregelten Ablauf der chemischen Reaktionen des Stoffwechsels verantwortlich. Als Strukturproteine, wie z.B. Kollagen, Elastin, Keratin, sind Proteine wesentlicher Bestandteil von Stützgewebe, Bindegewebe und Biomembranen. In Form von kontraktile Proteine, wie Aktin und Myosin, ermöglichen sie die Kontraktion der Muskeln. Immunglobuline oder Interferone bilden spezifische körpereigene Abwehrproteine und stehen so im Dienste des Immunsystems. Als Trägerproteine, wie z.B. Hämoglobin, Serumalbumin oder Transferrin sind Proteine am Transport von Sauerstoff, Fettsäuren, Hormonen, Medikamenten, Stoffwechselprodukten und Metallionen sowie an Elektronenübertragungsprozessen, wie der Atmungskette und der Fotosynthese beteiligt. Als Speicherproteine, wie z.B. Eialbumine, Casein der Milch, Gliadin (Weizensamen) oder Zein (Maissamen) sichern sie die Aminosäurereserve des Organismus. Durch Rezeptorproteine vermitteln sie die spezifische Wirkung von Wirkstoffmolekülen am Wirkort. Als Membranproteine werden sie auf Zelloberflächen präsentiert und ermöglichen so die Erkennung eines Zelltyps durch einen anderen und spielen deshalb eine Rolle bei der Morphogenese und der Erkennung fremden Gewebes, wie z.B. bei der Transplantatabstoßung. Darüber hinaus sind Proteine bei der Blutgerinnung, der Spezifizierung der Blutgruppen, der Steuerung der Genaktivitäten und bei der Regulation vieler anderer biochemischer Prozesse, wie der Translation, von entscheidender Bedeutung.<sup>[1]</sup>

Die Bausteine der Proteine sind bestimmte als proteinogen, also proteinaufbauend, bezeichnete Aminosäuren, die durch Peptidbindungen zu Ketten verbunden sind. Beim Menschen handelt es sich um 22 verschiedene Aminosäuren – die 20 seit langem bekannten (siehe Tabelle 1), sowie Selenocystein und Pyrrolysin.<sup>[2]</sup>

Amino Acid	Three-letter Code	One-letter Code
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic Acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic Acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

**Tabelle 1:** Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren.<sup>[3]</sup>

Die Primärstruktur zeichnet sich durch die Bildung von Wasserstoff-Brücken zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und dem Stickstoff der Amino-Gruppe von nicht direkt benachbarten Aminosäuren Sekundärstrukturen aus, wie z.B. das  $\beta$ -Faltblatt und die  $\alpha$ -Helix. Diese lagern sich durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brückenbindungen, Disulfid-Brücken oder Ionenbindungen zu Tertiär- und Quartärstrukturen zusammen.



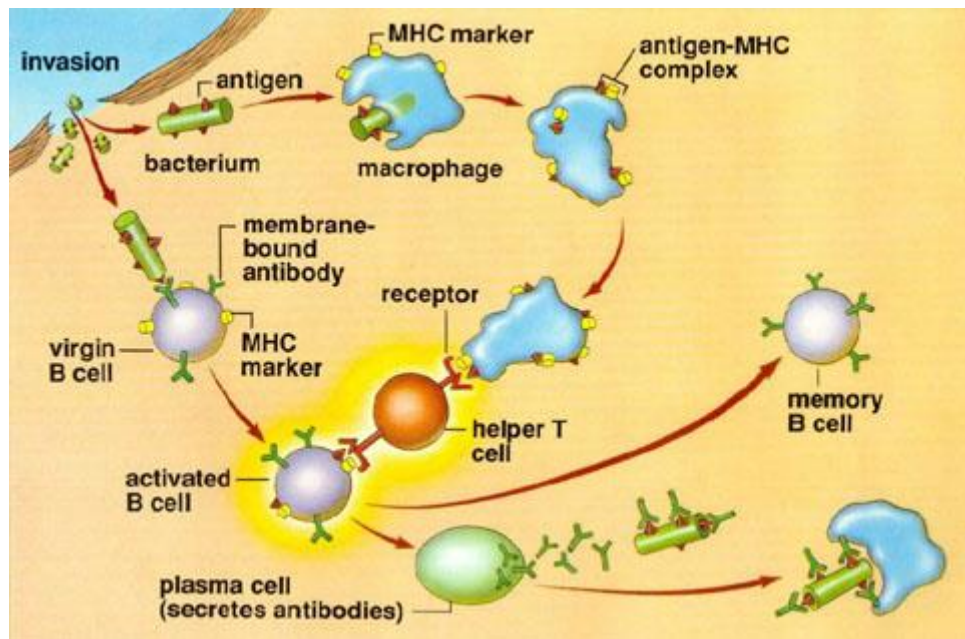
**Abb. 1:** Die vier Betrachtungsebenen der Proteinstruktur.<sup>[4]</sup>

Die Aminosäureketten können eine Länge von bis zu mehreren tausend Aminosäuren besitzen, wobei man Aminosäureketten mit einer Länge von unter ca. 100 Aminosäuren als Peptide bezeichnet und man erst ab einer größeren Kettenlänge von Proteinen spricht. Die molekulare Größe eines Proteins wird in der Regel in Kilo-Dalton (kDa) angegeben. Proteine brauchen, um ihre Funktion ausüben zu können, eine Mindestgröße. Zwar können bereits Di- und Tripeptide als Hormon agieren, für eine Enzymfunktion jedoch sind mindestens 50 bis 100 Aminosäuren notwendig. Andererseits können Proteine nicht unbegrenzt viele Aminosäuren enthalten, da diese durch die Verfügbarkeit der Aminosäurebausteine in der Zelle begrenzt ist.

## 1.1 Antikörper und ihre Funktionen<sup>[5], [6]</sup>

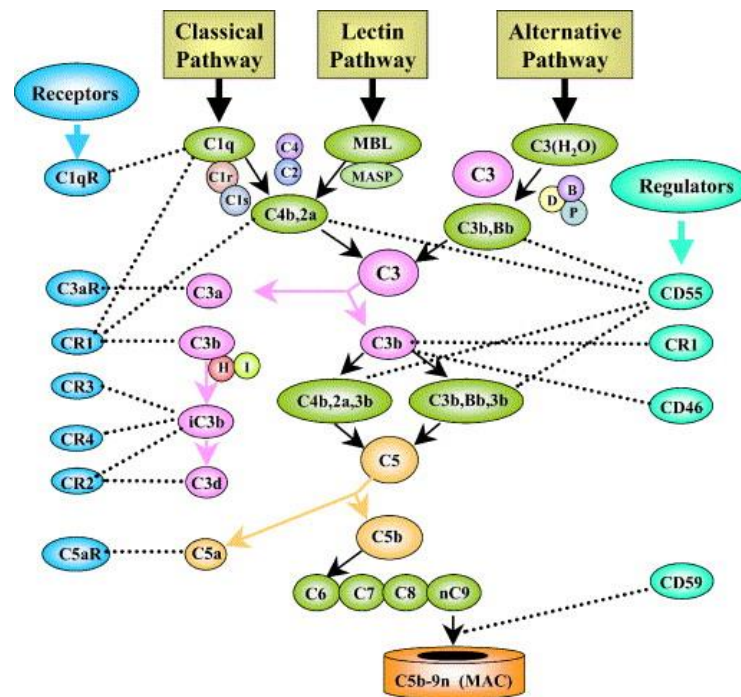
Eine Form der Proteine bildet die Klasse der Globuline. Diese im Blutplasma von Lebewesen vorkommenden Proteine sind in Wasser unlöslich, jedoch können sie mit verdünnten Neutralsalzlösungen gelöst werden. Globuline erfüllen zahlreiche Aufgaben, unter anderem als Enzyme, Energielieferanten und als Transport-Proteine. Doch ihre wichtigste Funktion erfüllen sie als Immunglobuline im Rahmen der spezifischen Abwehr des Immunsystems gegen körperfremde Stoffe und Mikroorganismen. Zu ihren Aufgaben gehören fremde, krankheitsauslösende Substanzen, wie Viren und Bakterien zu erkennen und zu zerstören. Immunglobuline sind in der Lage, bestimmte molekulare Strukturen, so genannte Antigene, spezifisch zu erkennen und daran zu binden. Durch diese Bindung werden physiologische Prozesse ausgelöst, welche die Krankheitserreger unschädlich machen, wodurch der Organismus vor dem jeweiligen Befall geschützt wird. Antikörper sind hoch spezifisch und können selbst die kleinsten molekularen Unterschiede erkennen. Produziert werden Antikörper von den B-Lymphozyten, einer bestimmten Sorte der weißen Blutkörperchen. Für jedes Antigen wird ein spezieller Antikörper gebildet.

Generell kann man hierbei von drei unterschiedlichen Hauptaufgaben der Immunglobuline, den so genannten Funktionen sprechen, die dabei auch zum Teil hintereinander ablaufen und wirken können. Zunächst einmal ist als Funktion der Antikörper die Opsonierung zu nennen. Hierbei wird die Oberfläche einer in den Körper eingedrungenen Fremdzelle mit Antikörpern bedeckt, sodass diese von den phagozytierenden Zellen, die Fresszellen des Immunsystems, besser erkannt werden. Dafür binden die Phagozyten mit ihren Rezeptoren an den konstanten Teil der Antikörper und regen so eine Phagozytose an.



**Abb. 1.1.1:** Übersicht der zellulären und humoralen Immunabwehr.<sup>[7]</sup>

Als weitere Funktion der Antikörper im Immunsystem wird der so genannte Antigen-Antikörperkomplex angesehen. Dabei wird das Komplementsystem durch Antikörperbindung aktiviert, wodurch es opsonin arbeiten kann. Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf insgesamt drei Wegen erfolgen (vgl. **Abbildung 1.1.2**). Es wird ein alternativer Weg der Komplementaktivierung vom klassischen Weg der Komplementaktivierung durch Antigen-Antikörper-Komplexe unterschieden. Darüber hinaus existiert noch einen weiterer Weg zur Komplementaktivierung, der Lectin-Weg.



**Abb.1.1.2:** Klassischer, Alternativer und Lektin-Weg der Aktivierung des Komplementsystems.<sup>[8]</sup>

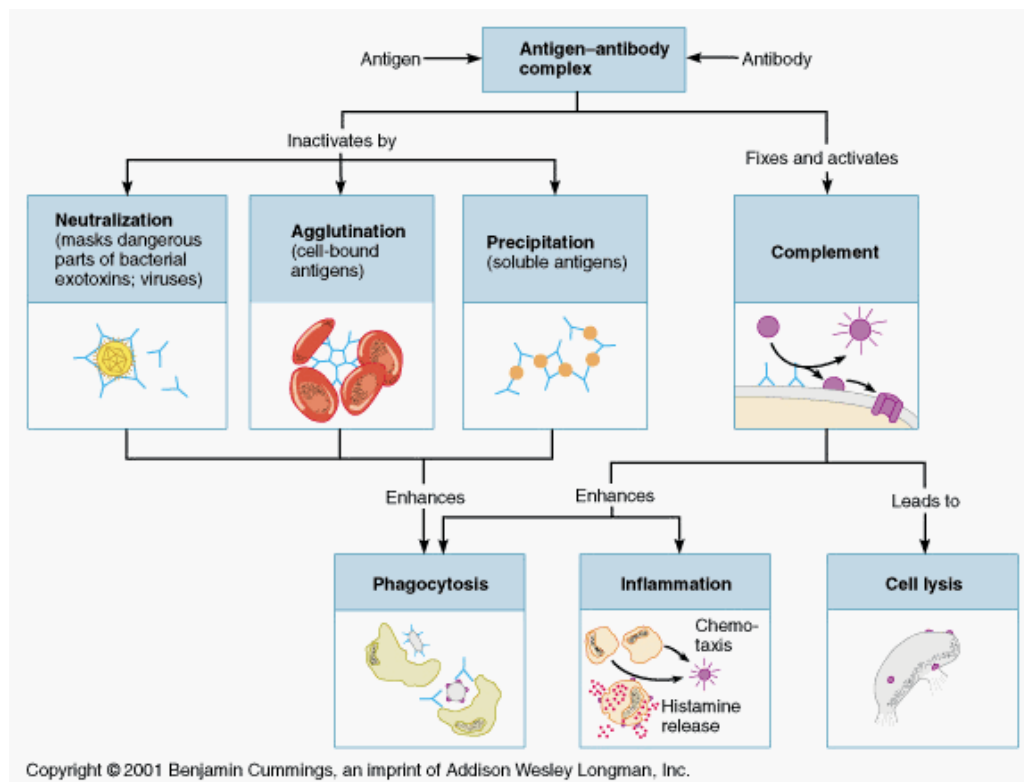
Der klassische Weg beginnt mit der Bindung von Antikörpern an Membranoberflächen. Der Kontakt des Fab-Bereichs mit dem Antigen erwirkt über eine Konformationsänderung die Aktivierung eines Oberflächenbereichs im Fc-Teil, an den die C1-Komponente gebunden wird. Es kommt zur schrittweisen Bildung vom C4b2a-Komplex, auch C3-Konvertase genannt. Diese wiederum spaltet C3 und C5, wodurch die Fragmente C3a und C5a freigesetzt werden, welche starke lokale Entzündungsmediatoren darstellen. Das freigesetzte C3b-Fragment bindet an die Bakterienoberfläche, was Immunadhärenz, Opsonierung und Konglutination bewirkt. Das Fragment 5b initiiert die Bildung eines porenbildenden cytolytischen Komplex C5-C9, auch Membran-Angriffskomplexes (MAC) genannt, zur Abtötung von fremden Mikroorganismen und allopathen Zellen. Dieser Komplex bildet in der Zellmembran eine Pore, durch die insbesondere Wasser und Ionen in die Zelle einströmen und diese zerstören können (siehe **Abbildung 1.1.2**).

Der alternative Weg funktioniert vergleichsweise langsam und ist immer etwas aktiv. An der Pathogen-Oberfläche werden autokatalytisch kleine Mengen C3b gebildet. Dieses spaltet C5 unter Beteiligung der Faktoren B und D und setzt somit das Fragment C5b frei, welches zusammen mit den Faktoren C6, C7, C8 und C9 den

Membran-Angriffskomplexe bildet, der fremde Mikroorganismen und allogene Zellen abtötet.

Darüber hinaus gibt es einen weiteren Weg der Komplementaktivierung, der MB-Lektin-Weg. Ein mannosebindendes Lektin (MBL) des Blutplasmas (sein Fehlen führt zu Infektionsneigung schon in der frühen Kindheit) bindet an Mannose auf der Oberfläche von Pathogenen. Das aktiviert Serinproteasen, die als MASP (*MBL-associated serine proteases*) bezeichnet werden (MASP-1 und MASP-2). Diese bilden wie im klassischen Weg aus C2 und C4 eine C3-Konvertase.

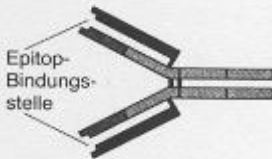
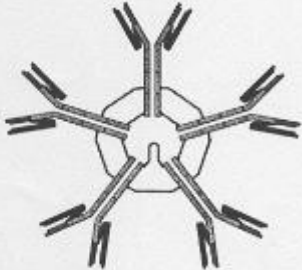

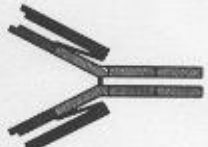
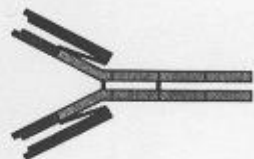
Die dritte Hauptfunktion der Antikörper beinhaltet die direkte Einwirkung auf den Eindringling. Hierbei kann es sich um Pilze, Viren oder aber auch Bakterien handeln. Diese werden durch Antikörper neutralisiert, indem sie den Krankheitserreger beispielsweise „verkleben“ und so zu größeren Komplexen zusammenschließen, wodurch das Eintreten in Gewebe und Zellen verhindert wird. Welcher Effektormechanismus zum Tragen kommt, wird durch die Immunglobulinklasse bzw. den Isotyp bestimmt.



**Abb.1.1.3:** Überblick der Mechanismen zur Abwehr körperfremder Zellen, ausgelöst durch den Antigen-Antikörper-Komplex.<sup>[9]</sup>

## 1.2 Immunglobulinklassen<sup>[5], [10]</sup>

Immunglobuline haben eine identische Grundstruktur, bestehend aus vier Polypeptidketten, zwei identische leichte Ketten und zwei identische schwere Ketten. Jede Kette verfügt über einen konstanten und einen variablen Anteil. Der variable Teil liefert die Antigenbindungsstelle, der konstante Teil die Effektorfunktionen des Antikörpers. Aufgrund der unterschiedlichen Genabschnitte für die konstanten Teile der schweren Kette werden Antikörper in insgesamt 5 Isotypen eingeteilt. Diese kommen in verschiedenen Kompartimenten des Körpers vor und haben unterschiedliche Aufgaben. Man unterscheidet zwischen IgA, IgD, IgE, IgM und IgG (vgl. **Abbildung 1.2.1**).<sup>[11]</sup>

Klasse	Strukturschema	Hauptaufgaben
IgG		häufigste Antikörper (70-75 %) der Immunglobuline, vorwiegend in Lymphe und Zwischenzellflüssigkeit
IgM		ca. 10 % der Immunglobuline, führen ersten Angriff gegen Mikroorganismen in der Blutbahn durch
IgA		ca. 15 % der Immunglobuline, vorwiegend in Schleimhäuten und Darmwand, außerdem in der Muttermilch (s. 2.1.1), schützen Schleimhäute
IgD		unter 1 % der Immunglobuline, beeinflussen Lymphozyten
IgE		unter 1 % der Immunglobuline, verantwortlich für viele Allergie-Reaktionen (s. 2.5.1), binden an Mastzellen, aktivieren das Immunsystem

**Abb. 1.2.1:** Struktureller Aufbau der Immunglobulinklassen IgA, IgD, IgE, IgM und IgG.



Das Immunglobulin A (IgA) ist spezialisiert auf die Abwehr von Antigenen an den Oberflächen der menschlichen Schleimhäute, z. B. in Nase, Rachen und Darm. Es kommt in zwei Subklassen, IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub> vor. Ihr Anteil an der gesamten Antikörpermenge beträgt ungefähr 15 Prozent. Häufig werden Krankheitserreger und Allergene schon durch die IgA abgefangen und neutralisiert. Dringen die Erreger aber tiefer ein, kommt es zu einer Immunreaktion. Die Plasmazellen sezernieren IgA als dimeres Protein, welches durch ein cysteinreiches Protein stabilisiert ist, das als *Joining Peptide* bezeichnet wird. Ein weiteres Protein, welches an das IgA assoziiert ist, wird als sekretorische Komponente bezeichnet. Diese vermittelt dem IgA einen gewissen Schutz vor der Aktivität proteolytischer Enzyme in den Sekreten der Schleimhäute. Die sekretorische Komponente vermischt sich im Darm mit dem Mucin und bildet eine schützende Oberflächenschicht, die die Anlagerung von Bakterien an die Epitheloberfläche verhindert. Die Halbwertszeit des IgA beträgt 5-6 Tage.

Das Immunglobulin D (IgD) ist im Serum nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Über seine genaue Funktion und Bedeutung ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sehr viel bekannt. Es wird aber vermutet, dass es bei der Aktivierung der B-Lymphozyten eine Rolle spielt, denn es wird durch alternatives Spleißen auf der Oberfläche von reifen B-Lymphozyten membranständig co-exprimiert und kreist mit ihnen im Blutstrom.

Das Immunglobulin E (IgE) ist ebenfalls stark spezialisiert und spielt bei der Abwehr von Wurminfektionen und bei Allergien eine Rolle. Es stammt aus dem Lymphgewebe, das in der Nähe der Atemwege und des Verdauungstraktes liegt. Von dort aus gelangt das IgE ins Blut, wo es durch Fc-Rezeptoren auf Mastzellen gebunden wird. Aus diesem Grund ist nahezu alles IgE membrangebunden, im Blut ist es praktisch nicht vorhanden. IgE ist nur in winzigen Mengen nachweisbar. Nur 0,001 Prozent aller Immunglobuline sind vom IgE-Typ. Trotzdem spielt es bei über 90 Prozent aller allergischen Prozesse eine wichtige Rolle und ist vor allem in der Haut und in den Schleimhäuten zu finden, die bei allergischen Reaktionen auf Allergene beteiligt sind. Kommen Allergene auf der Haut und den Schleimhäuten mit IgE in Berührung, bewirkt das IgE eine Veränderung in der Funktion verschiedener Zellen. Diese Veränderungen führen zur Ausschüttung von Stoffen aus den Zellen, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Diese Stoffe werden Mediatoren oder Mittlersubstanzen genannt. Der bekannteste Mediator ist das Histamin.

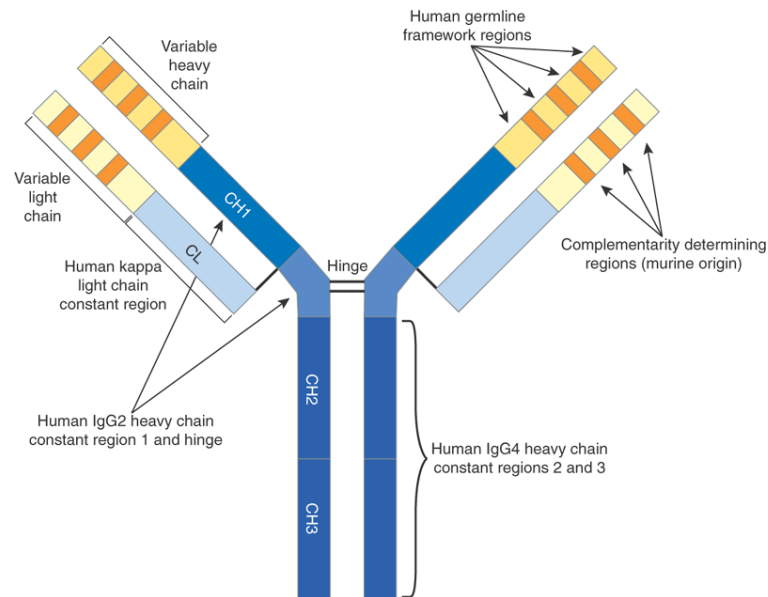
Wenn ein fremder Erreger in den Organismus gelangt, reagiert der Körper als erstes mit der Produktion von Immunglobulin M (IgM). Weil IgM so schnell zur Verfügung steht, wird er gelegentlich auch als Frühantikörper bezeichnet und ist damit ein diagnostischer Indikator für Erstinfektionen, wie z.B. die Toxoplasmose bei Schwangeren. IgM ist ein Pentamer, bestehend aus fünf Protein-Untereinheiten. Auch diese Untereinheiten sind durch das cysteinreiche *Joining Peptide* verbunden. IgM agglutiniert, aufgrund seiner 10 Bindungsstellen, sehr stark und bindet auf diese Weise bevorzugt polymere Antigene. Der Antigen-Antikörperkomplex von IgM-Pentameren aktiviert den klassischen Weg des Komplementsystems am stärksten. Die Halbwertszeit von IgM beträgt etwa 5-6 Tage.

Die weitaus größte Menge der Antikörper ist mit ungefähr 75 % das Immunglobulin G (IgG).<sup>[12]</sup> Das IgG wird bei einer Erstinfektion erst nach ungefähr drei Wochen gebildet. Erst dann lässt es sich mit Hilfe der Elektrophorese nachweisen. Tritt dieselbe Infektion aber noch einmal auf, so werden IgG Antikörper sehr schnell und in sehr großer Menge produziert, um den erneuten Ausbruch einer Erkrankung zu verhindern. Krankheiten mit einem angeborenen oder erworbenen Mangel an Antikörpern betreffen oft IgG. Bildet der Körper gegen eigene Körperbestandteile Antikörper, so genannte Autoantikörper, spricht man von einer Autoimmunkrankheit. IgG ist vor allem bei der Neutralisation von Toxinen, welche von Bakterien gebildet werden, und bei der Opsonierung von Mikroorganismen beteiligt. Die vier Subklassen, IgG<sub>1</sub> bis IgG<sub>4</sub> unterscheiden sich hauptsächlich in der Hinge-Region (vgl. **Abbildung 1.3.3**). IgG besitzt eine Halbwertszeit von 20 Tagen.

### 1.3 Immunglobulin G, Aufbau und Funktion

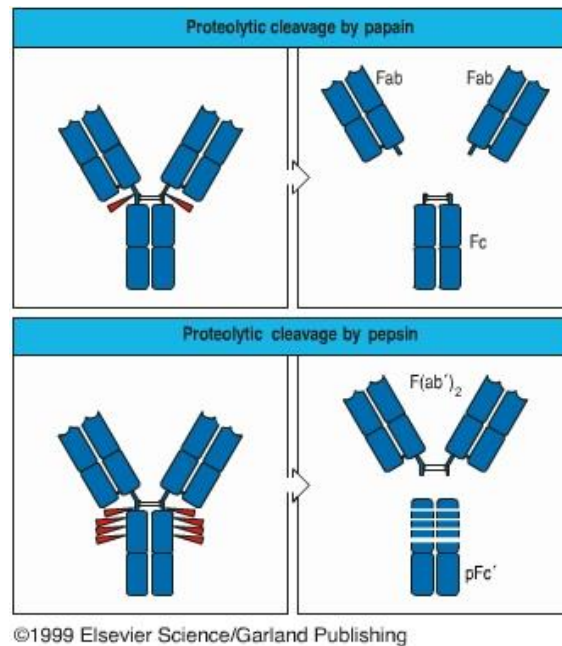
Ein IgG-Molekül besteht aus insgesamt vier Polypeptidketten unterschiedlicher Größe, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es gibt zwei Ketten mit ca. 50 kDa und zwei mit etwa 25 kDa. Demnach spricht man von schweren (heavy) und leichten (light) Ketten, also von H-Ketten bzw. L-Ketten. Jede Kette lässt sich jeweils in noch kleinere Strukturteile unterteilen. Es handelt sich hierbei um ähnlich aufgebaute, kugelförmige Anteile des Proteins mit jeweils ungefähr 110 Aminosäuren, die durch Disulfidbrücken zusammen gehalten werden. Die L-Kette setzt sich aus zwei dieser Untereinheiten zusammen, die H-Kette aus vier. Sie werden als Domänen bezeichnet. Bei der Betrachtung der Antikörperstruktur im Hinblick auf die strukturelle Variabilität ergibt sich die Unterscheidung in variable (V) und konstante (C)-Region. Die variable Region ist strukturell vielgestaltig, um die mehr als  $10^7$  Antigenepitope unterscheiden zu können. Jede Immunglobulinkette besitzt eine variable Domäne (VL und VH). Die leichten Ketten haben nur eine konstante Domäne (CL), die schweren Ketten besitzen drei konstante Domänen (CH1, CH2, CH3). Zwischen CH1 und CH2 befindet sich die so genannte Hinge-Region, eine kurze, bewegliche Polypeptidkette, die dem Antikörpermolekül die notwendige Flexibilität verleiht.<sup>[13]</sup>

Während die Aminosäuresequenz im Bereich der konstanten Domänen bei verschiedenen Antikörpern eines Isotyps weitgehend gleich ist, zeigen sich innerhalb der variablen Domänen große Sequenzunterschiede. Die Sequenzvariationen sind aber nicht über die komplette variable Region verteilt, sondern konzentrieren sich auf drei hypervariable Domänen, die **Complementarity Determining Regions** (CDRs). Diese sind zwischen Proteindomänen mit geringerer Sequenzvariabilität, den **Framework Regions** (FRs) eingebettet. Die FRs besitzen  $\beta$ -Faltblattstruktur und ordnen sich räumlich so an, dass die CDRs im funktionell gefalteten Protein direkt nebeneinander liegen. Über die hypervariablen Bereiche von leichter und schwerer Kette erfolgt die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen.<sup>[14]</sup>



**Abb. 1.3.:** Aufbau eines IgG-Moleküls. <sup>[15]</sup>

Mit Hilfe von verschiedenen Enzymen lassen sich Proteine an charakteristischen Positionen spalten. Bei den Immunglobulinen nutzt man dies vor allem, um Funktionen unterschiedlicher Teile des Moleküls voneinander zu trennen. Gibt man zu einer Lösung mit IgG-Antikörpern die Protease Papain hinzu, so werden die Moleküle in drei Fragmente gespalten: zwei, die noch in der Lage sind, Antigene zu binden und eines, welches mit anderen seiner Art leichte Kristalle bildet. Die ersten beiden Fragmente nennt man antigen-bindende Fragmente (Fab), das dritte kristallisierbares (crystallizable) Fragment (Fc). Durch die Protease Pepsin wird das Molekül etwas tiefer, nämlich unterhalb der Disulfidbrücke gespalten, die beide H-Ketten verbindet. Beide Fab-Teile bleiben zusammen und das Fc-Stück wird teilweise zerstört. Es entstehen so zwei Fragmente: ein  $F(ab')_2$ - und ein  $Fc'$ -Fragment. Der Zusatz " ' " bezeichnet die leichte Veränderung des Molekülfragmentes gegenüber den Spaltstücken nach Papain.



**Abb. 1.3.1:** Proteolytische Spaltung des IgG-Moleküls durch Papain und Pepsin.

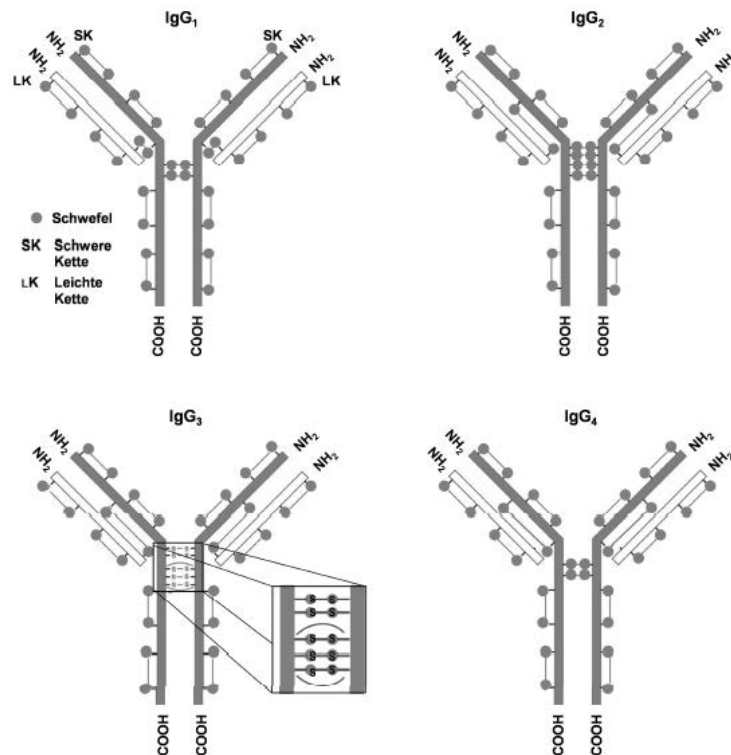
IgG liegt stets als Monomer vor und hat ein Molekulargewicht von ca. 150.000 Da. Allerdings ist der Wert für die Molekülgröße ein Durchschnittswert, denn das menschliche IgG kann in vier Klassen eingeteilt werden, welche anhand ihrer Konzentrationen im Serum nummeriert wurden.<sup>[12], [16]</sup>

Die Subklassen des IgG haben den prinzipiellen Aufbau gemeinsam und unterscheiden sich morphologisch in ihrer konstanten C-Region der schweren Kette. Dort unterscheiden sie sich hinsichtlich Größe, Aminosäuresequenz, Auftreten von Hinge-Regionen, Anzahl der Disulfidbrücken zwischen der CH1- und CH2-Domäne der schweren Kette, sowie den unterschiedlichen Zuckerresten. Die vier IgG-Subklassen unterscheiden sich nicht nur biochemisch und physikalisch, sondern insbesondere auch hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen in der Immunabwehr, wobei deren Mangel zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen kann (vgl. **Abbildung 1.3.2**).

Mangel	Assoziierte Erkrankung
<b>IgG<sub>1</sub></b>	meist zusammen mit IgG <sub>2</sub> und IgG <sub>3</sub> ; häufig bei variablem Immundefektsyndrom; sekundären Immunstörungen, nephrotischem Syndrom
<b>IgG<sub>2</sub></b>	Infektionen der oberen und tiefen Atemwege; Autoimmunerkrankungen, Autoimmunthrombozytopenie, erhöhte Anfälligkeit gegenüber bekapselten Bakterien
<b>IgG<sub>2</sub></b>	häufige Kombination bei Kindern
<b>IgG<sub>2</sub> und IgA</b>	20 % der Patienten mit IgA-Mangel sind auch von IgG <sub>2</sub> -Mangel betroffen; erhöhte Neigung zur Sepsis mit bekapselten Bakterien
<b>IgG<sub>3</sub></b>	Rezidivierende Infekte der oberen Luftwege, Asthma bronchiale, Durchfälle
<b>IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub></b>	schwerwiegende Infekte, häufig mit obstruktiver, teilweise mit Bronchiektasenbildung einhergehende Lungenerkrankung
<b>IgG<sub>4</sub></b>	häufig ohne klinische Relevanz (5,8% der Gesunden sind betroffen), häufig kombiniert

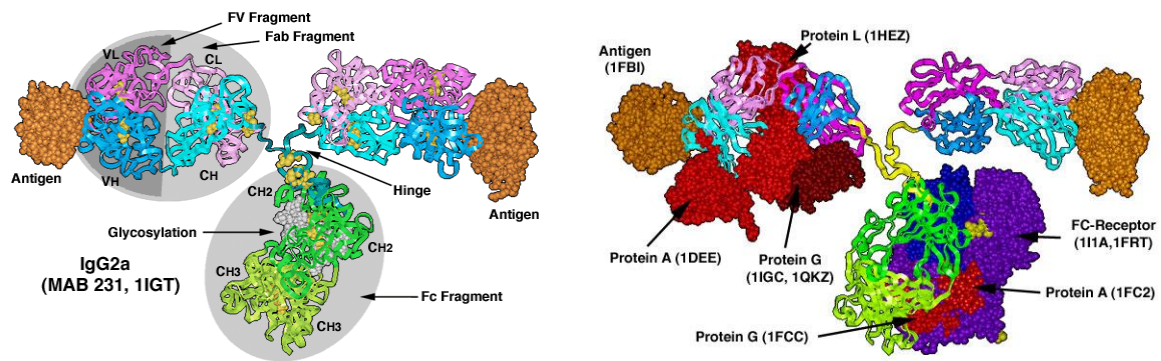
**Abb. 1.3.2:** Überblick über den Zusammenhang spezifischer IgG-Subklassen und klinischen Symptomen.

IgG1 stellt mit ca. 70% die häufigste IgG-Fraktion dar. Es folgen IgG2, IgG3 und IgG4. Den auffälligsten Aufbau hat IgG3 durch seine sehr lange Hinge-Region, die aus vielen Disulfidbrücken besteht. Die verschiedenen IgG-Subklassen übernehmen sehr spezielle Aufgaben bei der Immunabwehr. Einige leiten den klassischen Weg der Komplementaktivierung ein (vor allem IgG3), binden an Fc-Rezeptoren von Neutrophilen und Makrophagen (IgG1 und IgG3) und IgG2 sowie IgG4 sind als einzige Antikörper plazentagängig. Abbildung 1.3.3 zeigt die Struktur der vier IgG-Subklassen.<sup>[17], [18]</sup>



**Abb. 1.3.3:** Strukturunterschiede der IgG-Subklassen.

Unabhängig von der Antigen-Bindungsstelle (CDR) existieren noch weitere Bereiche auf dem IgG-Molekül, an denen sich Proteine binden können, wie z.B. das Bindungssepitop für den Fc-Rezeptor. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Opsonierung, das heißt bei der Erkennung fremder Zellen durch Makrophagen. Ein Weg, wie krankheitsauslösende Bakterien die Immunabwehr ihres Wirts überlisten können, ist das Auskleiden der Bakterienzellwand mit verschiedenen wasserlöslichen Plasmaproteinen. Viele Gram-positive Bakterien exprimieren dazu auf ihrer Zelloberfläche verschiedene Proteine, die in der Lage sind an Immunglobulinen zu binden. Das Bakterium *Staphylococcus aureus* hat auf seiner Oberfläche ein Molekül (Protein A) exprimiert, mit dem es das Fc-Fragment von IgG binden kann. Gebundenes IgG kann keine Immunreaktion mehr vermitteln. Selbst nach Bindung eines Antigens an den noch freien Antigen-bindenden V-Regionen keine Effekte mehr durch die Fc-Fragmente eingeleitet werden können, da dieses Protein A die Bindung zum Fc-Rezeptor unterbindet. Auf diese Weise gelangt das Bakterium ungehindert in den Wirt.



**Abb. 1.3.4:** Kristallstruktur des IgG im Komplex mit einem Antigen (links), Kristallstruktur des IgG in Interaktion mit Protein A, Protein G und Protein L jeweils mit PDB-code.<sup>[19]-[27]</sup>

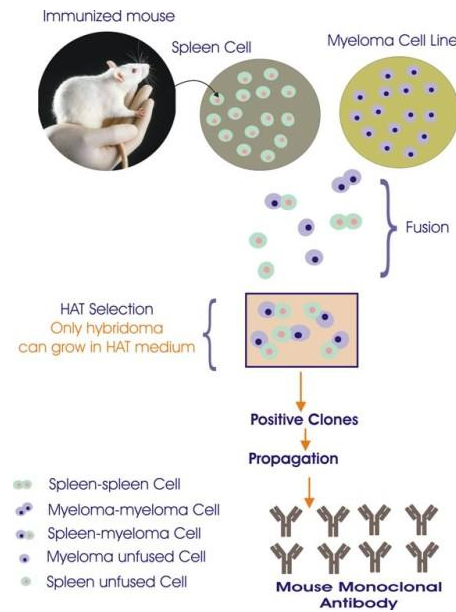
Ein weiteres Protein, welches mit hoher Affinität an dem Fc-Teil des IgG bindet, ist das Protein G, das auf der Zellwand von einigen *Streptococci* zu finden ist. Dieses Protein ist ebenfalls in der Lage, die Bindung des Fc-Rezeptors an den Fc-Teil zu blockieren. Zusätzliche Bindungssepitope für beide Proteine sind in einigen VH- (für Protein A) und CH-Domänen (für Protein G) zu finden. Dies erklärt warum beide Proteine ebenso eine jedoch viel geringere Affinität für die Fab-Fragmente aufweisen. Als drittes Protein ist das Protein L zu erwähnen, welches man von der Oberfläche von *Peptrostreptococcus magnus* isolieren konnte. Dieses Protein bindet allerdings nur an die variable Domäne der leichten Kette, ohne die Antigen-Antikörper-Bindung zu beeinflussen (vgl. **Abbildung 1.3.4**).



## 1.4 Monoklonale ABs und ihre medizinische Relevanz

Man unterscheidet grob zwischen zwei Typen von Immunglobulinen: Polyklonale Antikörper, die mehrere verschiedene Epitope auf einem Antigen erkennen, und monoklonale Antikörper (mAb), die nur ein einzelnes Epitop erkennen. Monoklonale Antikörper sind daher hochspezialisierte und zielgerichtete Antikörper, die von einer Zelllinie produziert werden, welche auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgeht.<sup>[28]</sup> Natürlicherweise entstehen monoklonale Antikörper paraneoplastisch im Rahmen eines multiplen Myeloms. Dabei produziert eine maligne Plasmazellpopulation einen einzigen pathologischen Antikörper. Sollen monoklonale Antikörper technisch oder medizinisch eingesetzt werden, bedient man sich dazu meist der Hybridom-Technik. Hierbei werden B-Lymphozyten, die den gewünschten Antikörper produzieren, mit Myelomzellen fusioniert, welche dann weiter kultiviert und vermehrt werden können. Dieses Prinzip wurde 1975 von *César Milstein*, *Georges Köhler* und *Niels Jerne* erstmals publiziert.<sup>[29]</sup> Sie erhielten 1984 den Nobelpreis für Medizin für die Entwicklung dieser Hybridom-Technik.<sup>[30]</sup>

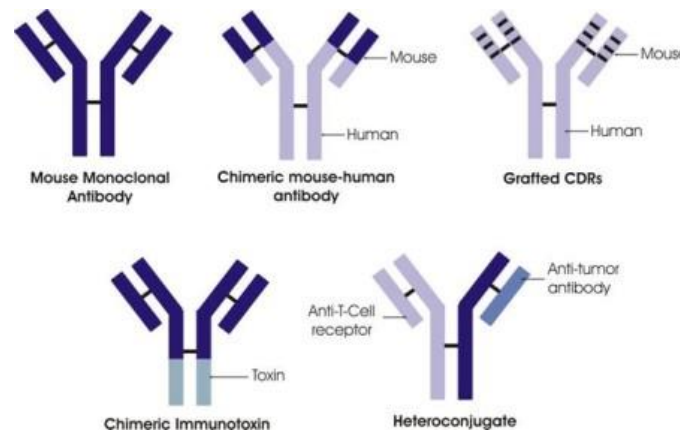
Hergestellt werden die monoklonalen Antikörper nicht mehr im Körper eines Tieres (in vivo), sondern im Reagenzglas (in vitro). Dafür wird eine Maus mit der zu behandelnden Krankheit infiziert. Nachdem das Immunsystem der Maus polyklonale Antikörper entwickelt hat, werden ihr Immunzellen entnommen. Die Immunzellen der Maus werden durch Fusion jeweils mit einer Tumorzelle verschmolzen. So entstehen neue Zellen, die Hybridomazellen genannt werden. Die Hybridomazellen haben jetzt die Eigenschaften beider Ursprungszellen in sich vereint: Sie können Antikörper produzieren und gut in einer Kultur wachsen.<sup>[31]</sup> Die von den unterschiedlichen Hybridomazellen produzierten Antikörper werden auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Die am häufigsten angewandten Methoden hierbei sind Radioimmunoassay, ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay), Immunofluoreszenz, Rosetting Assay und Western Blot. Schließlich wird die gewünschte Hybridomazelle mit Hilfe der FACS-Methode (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orter) herausgesucht und anschließend vervielfältigt. Jede dieser Zellklone kann nun den gesuchten monoklonalen Antikörper produzieren.



**Abb. 1.4.1:** Produktion von monoklonalen Antikörpern.<sup>[32]</sup>

Auf diese Weise ist es möglich, monoklonale Antikörper unbegrenzt zu reproduzieren. Der erste Antikörper, der in die Therapie eingeführt wurde, war 1986 Muromonab-CD3 zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach allogener Nieren-, Herz- und Lebertransplantation. Muromonab bindet spezifisch an das CD3-Oberflächenantigen von T-Lymphozyten und unterbricht so die Immunantwort. Die hohen Erwartungen an die spezifische Therapie wurden durch die regelmäßige Bildung von Anti-Antikörpern, die den therapeutischen Effekt reduzieren, enttäuscht. Anaphylaktische Reaktionen auf das Fremdeiweiß werden als seltene Nebenwirkung beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese monoklonalen Antikörper leider immer noch Mausbestandteile besitzen, die dazu führen, dass das menschliche Immunsystem sie als fremdartig erkennt und eine Immunreaktion hervorruft. Deshalb ist ein weiterer Schritt erforderlich: Mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren werden die konstanten Mausbestandteile aus dem Bau des monoklonalen Antikörpers entfernt und durch baugleiche konstante Teile menschlicher Antikörper ersetzt. Da diese konstanten Teile für die spezielle Wirkung des monoklonalen Antikörpers keine Rolle spielen, können sie ausgetauscht werden.<sup>[33]</sup> Der jetzt entstandene monoklonale Antikörper wird als chimärer monoklonaler Antikörper bezeichnet und wird vom Immunsystem des Menschen weniger häufig abgestoßen, die Immunogenität sinkt von 80% bei mausartigen (murine) mAbs auf ca. 5% für

chimäre mAbs. Gleichzeitig wird die geringe Halbwertszeit von 30-40 Stunden der murinen mAbs auf ca. 250 Stunden verlängert.<sup>[34]-[37]</sup>



**Abb. 1.4.2:** Gentechnisch veränderte monoklonale Antikörper.<sup>[32]</sup>

Die variablen Domänen der chimären mAbs sind allerdings immer noch in der Lage eine Immunantwort auszulösen,<sup>[38]</sup> weshalb man mAbs entwickelt hat, die als einzigen murinen Bestandteil die CDR-Domänen beinhalten.<sup>[39]-[41]</sup> Hierzu werden die DNA-Abschnitte für die sechs CDR-Domänen des murinen mAbs an das Gen für den humanen Antikörper gekoppelt, sodass ein hybridisierter, humanisierter mAb entsteht, welcher in geringerem Maße vom menschlichen Immunsystem abgestoßen wird als der chimäre mAb.<sup>[42]-[45]</sup> Darüber hinaus gibt es noch weitere gentechnisch veränderte Antikörper, wie z.B. Immunotoxin mAbs oder bi-spezifische mAbs, welche besonderen Einsatz bei Krebstherapien finden.

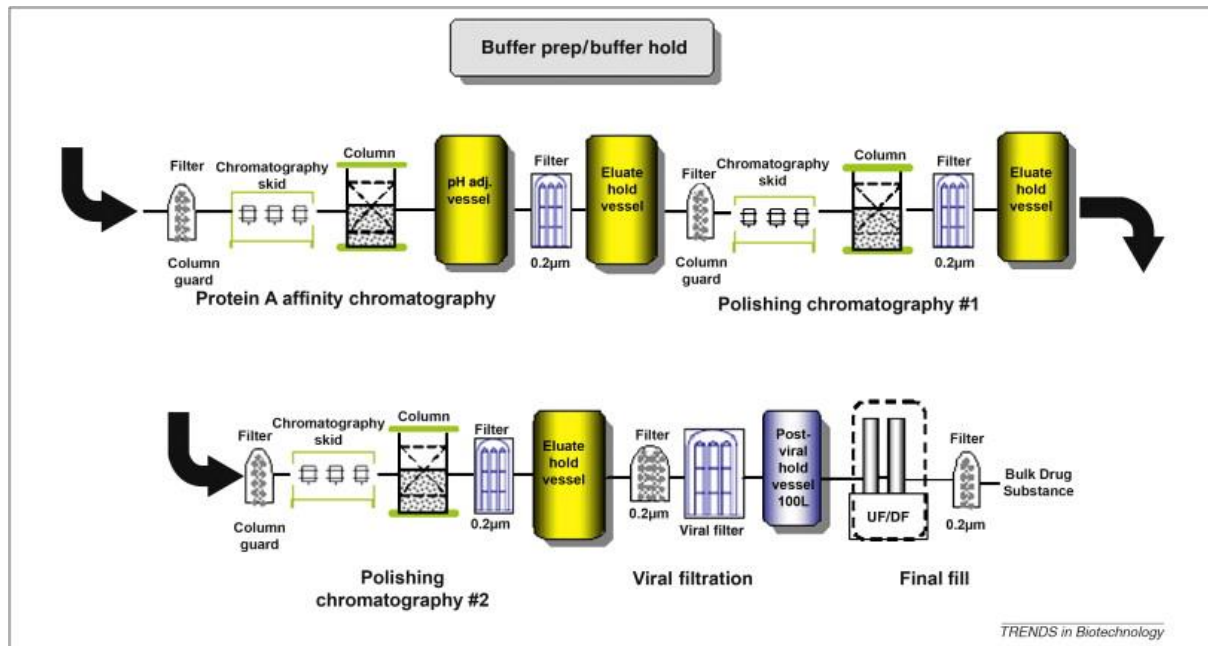
Rein humane Antikörper bieten den Vorteil, dass sich keine Antikörper gegen Mausproteine mehr bilden können. Bei der Phagen-Display-Technologie können humane monoklonale Antikörper ohne Mausanteil produziert werden. Hierbei handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, bei der die DNA für den jeweiligen Antikörper in das Bakteriophagen-Gen eingebaut wird. Diese Phagen infizieren dann Bakterien, wodurch neue Phagen mit dem veränderten Oberflächenprotein produziert werden. Die entstehenden Phagen können dann nach ihren Eigenschaften sortiert werden.

## 1.5 Downstream Processing

Die Reinigung und Anreicherung von Proteinen aus biologischem Material ist ein wichtiger Schritt in der biochemischen Produktion von monoklonalen Antikörpern. Kontaminationen während des Produktionsprozesses, wie Proteine, Nucleinsäuren, Endotoxine und verwendete Agentien müssen durch ausgewählte Reinigungsmethoden entfernt werden. Hierfür haben sich einige Methoden bewährt, wie z.B. das Ausfällen mit Ammoniumsulfat, die Zonenelektrophorese, die Ionen-Austauschchromatographie, die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), die Gel-Filtration und die Affinitätschromatographie.<sup>[46]</sup>

In einem dreistufigen Verfahren zur Reinigung von monoklonalem IgG, wird die Affinitätschromatographie häufig als erster Schritt, im sogenannten Capture-Schritt, verwendet. In diesem Capture-Schritt wird häufig Protein A als Ligand eingesetzt. Dabei nutzt man die spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Fc-Region des Immunglobulin G und immobilisiertem Protein A, einer Zellwandkomponente aus *Staphylococcus aureus* aus. Die relativ große Affinität liegt in der Größenordnung von  $10^8$ - $10^9$  M<sup>-1</sup>, wobei Protein A an IgG der Subklassen 1, 2 und 4 bindet.<sup>[47]</sup> Moderne Protein A-Affinitätsharze tragen meist rekombinante Protein A-Liganden. Die Protein A-Affinitätschromatographie ist gut etabliert und hochspezifisch für Immunglobulin G. In einem Protein A-Capture-Schritt kann üblicherweise eine Reinheit von über 95 Prozent erzielt werden. Um die höhere pharmazeutisch benötigte Reinheit zu erzielen, wird in der Regel die Protein A-Affinitätschromatographie mit anderen Chromatographiemodi kombiniert.

So werden im zweiten Schritt verbliebene Endotoxine und DNA durch die Ionen-Austauschchromatographie entfernt. Zum Schluss werden durch Gel-Filtrationschromatographie hoch- und niedermolekulare Substanzen von den monoklonalen Antikörpern abgetrennt. Dieser finale Schritt wird meist als „Polishing“ bezeichnet. Die reproduzierbare und sorgfältige Antikörperreinigung, meist in großem Maßstab, ist eine der wichtigsten Voraussetzungen zur Verwendung dieser Antikörper in der Diagnostik und Therapie.



**Abb. 1.5.1:** Downstream Prozess der monoklonalen Antikörper.<sup>[48]</sup>

Alternative Konzepte legen den Schwerpunkt entweder auf das Verringern der Anzahl chromatographischer Prozessschritte zu einem zweistufigen Verfahren oder auf die Entwicklung von Plattformen ohne Protein A. Die Eliminierung des Protein A-Schritts würde die bekannten Nachteile der Protein A-Chromatographie überwinden. Dazu gehören unter anderem

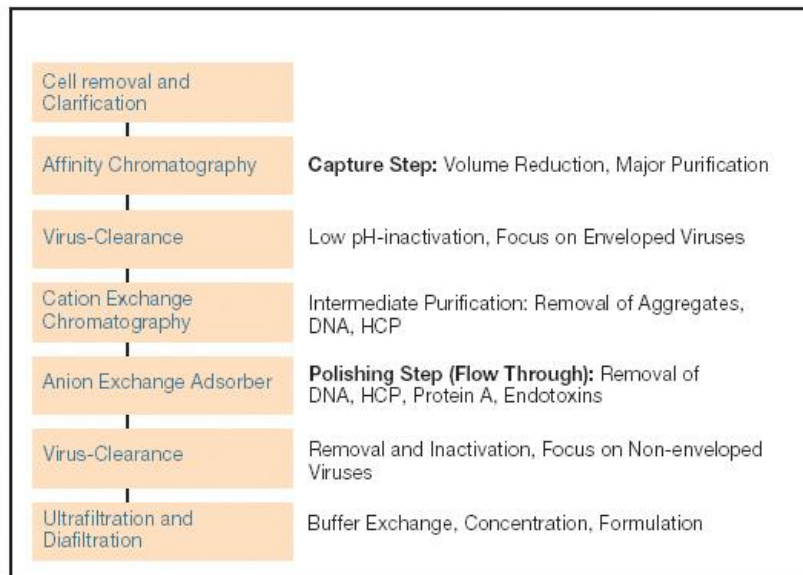
- die hohen Kosten,<sup>[49]</sup>
- das „Leaching“ des Protein A Liganden und die damit verbundene Kontaminierung des isolierten Immunglobulins,<sup>[50],[51]</sup>
- die Bildung von Aggregaten aufgrund der zur Elution erforderlichen sauren Bedingungen sowie der begrenzten mechanischen Stabilität und
- die damit verbundenen limitierten Säulendimension beziehungsweise Flussraten.

So haben *Lain et al.* den Einsatz von Kationenaustausch- Chromatographie als Ersatz für den Protein A-Schritt als mAb-Capture-Schritt vorgestellt.<sup>[52]</sup>

## 2 Aufgabenstellung

Die Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAb) entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten rasant weiter. Mehr als 70 Antikörper befinden sich derzeit in klinischer Erprobung. Damit stellt diese Gruppe den am schnellsten wachsenden Bereich der pharmazeutischen Industrie dar. Laut einer aktuellen Studie von Frost & Sullivan erwirtschaftete der Europamarkt für therapeutische monoklonale Antikörper einen Umsatz in Höhe von 19,01 Milliarden US-Dollar im Jahr 2011 und wird voraussichtlich 42,37 Milliarden US-Dollar in 2018 erreichen. Berechnet wurde dies mit einer durchschnittlichen jährlichen Wachstumsrate (CAGR) von 12,1 Prozent über denselben Zeitraum. Die spezifischen Werkzeuge versprechen die Arzneimittel der Zukunft zu werden. Die Anwendung von Antikörpern als Antiseren oder Passivimpfstoffe ist lange etabliert. Bekannte Beispiele sind Tetanus-Immunglobulin, Schlangengift-Immunsere (vom Pferd) oder Digitalis-Antitoxin (vom Schaf). Auch in Therapien für Krebs, Autoimmun-, Herz- und verschiedene Infektionskrankheiten finden mAbs immer häufiger Verwendung. Der Einsatz monoklonaler Antikörper z.B. in der Arzneitherapie stellt zweifelsohne einen therapeutischen Fortschritt dar, da es sich um neue chemische Entitäten mit neuartigem Wirkprinzip und therapeutischer Relevanz handelt. Hohe Entwicklungskosten stellen jedoch eine Barriere für Markteintritte im mittleren Segment dar. Die durchschnittlichen Produktionskosten für die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern bewegen sich zwischen 650 und 750 Millionen US-Dollar, die etwa eine Zeit von acht bis neun Jahre in Anspruch nimmt. Dieser Faktor verhindert den Markteinstieg von kleinen Biotechfirmen und begünstigt große Pharmaunternehmen wegen ihrer finanziellen Stärke und Möglichkeiten. Die Therapiekosten monoklonaler Antikörper liegen bei mehreren tausend Euro pro Therapiezyklus oder Jahr und damit hundertfach über denen herkömmlicher Therapien. Die Diskussion über die Kosten-Nutzen-Relation wird öffentlich geführt und monoklonale Antikörper werden daher in Deutschland im Vergleich zum europäischen Ausland zurückhaltend eingesetzt.<sup>[53]</sup> Ein Grund für die extrem hohen Produktionskosten und den daraus resultierenden hohen Therapiekosten sind größtenteils auf unzureichende Produktionskapazitäten zurückzuführen, welche aus den Aufarbeitungen („Downstream processing“) resultieren. Zurzeit basiert das Verfahren auf der Verwendung von effizienten, aber sehr teuren und labilen biologischen Rezeptoren wie z.B. Protein A/G, oder aber auf weniger

effizienten/selektiven, aber preisgünstigen und stabileren chemischen Affinitätsliganden. In der Regel erfolgt eine Kombination von zwei oder mehr Trenntechniken, um eine akzeptable Reinheit zu erzielen. Der „Downstream process“ ist demnach in drei zentrale Schritte unterteilt, das „Capturing“, die Trennung und das „Polishing“ . [54], [55]



**Abb. 2.1:** Übersicht der verschiedenen Reinigungs-Schritte monoklonaler Antikörper. [56]

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf dem „Capture“-Schritt. Ziel hierbei war es preiswerte Affinitätsmaterialien auf Basis von Copolymeren aus zwei, drei oder mehreren Haftmonomeren zu konzipieren, synthetisieren und evaluieren und gegebenenfalls die Trennleistung dieser neuen Affinitätsmaterialien mit etablierten Trennphasen, die Protein A als Rezeptor verwenden, zu vergleichen. Die Hauptaufgabe bestand zuerst in der Entwicklung einer großen Zahl von neuartigen spezifischen Haftmonomeren für einzelne Aminosäuren, die in ausreichender Menge an die Kollaborationspartner geliefert werden sollten, und auf diesem Weg im Rahmen des BMBF (**B**undes**m**inisterium für **B**ildung und **F**orschung) Projekts zu neuen antikörperselektiven Materialien verarbeitet werden sollten. Anschließend stand die Synthese von Affinitätspolymeren im Vordergrund, die zunächst in freier wässriger Lösung hergestellt und später auf feste Phasen immobilisiert werden sollten. So zerfällt die beschriebene Aufgabenstellung in zwei Zielsetzungen. Zum

einen die Entwicklung einer großen Zahl an Haftmonomeren mit hoher Spezifität für bestimmte Aminosäure-Seitenketten und ihr Einsatz im Epitop- und Protein-Imprinting, sowie in der Herstellung von Membranabsorbern. Hierfür sollten bekannte und neue Bindungsmotive für proteinogene Aminosäuren aus dem Bereich der supramolekularen Chemie in Methacrylamide überführt werden. Zum anderen die Entwicklung von antikörperselektiven Affinitätspolymeren mit Hilfe dieser Haftmonomere, und ihre Immobilisierung auf einem geeigneten Trägermaterial für die Anwendung im Capture-Schritt. Dafür sollte die Kristallstruktur des Protein A/IgG-Interfaces gründlich studiert werden und auf der für die molekulare Erkennung kritischen Aminosäurereste und ihrer Verteilung auf und um die Protein A-Bindungsstelle hin analysiert werden. Des Weiteren sollte ein Screeningverfahren entwickelt werden, das diese Polymere hinsichtlich ihrer Affinität zur Protein A-Bindungsstelle auf dem IL-8-spezifischen Immunglobulin quantifizieren kann und durch separate Fluoreszenztitrationen bestätigt werden soll. Darüber hinaus muss ein Verfahren entwickelt werden, welches in der Lage ist das beste Affinitätspolymer auf einer festen Phase zu immobilisieren, um im Anschluss erfolgreich im „Capture“-Schritt eingesetzt zu werden.

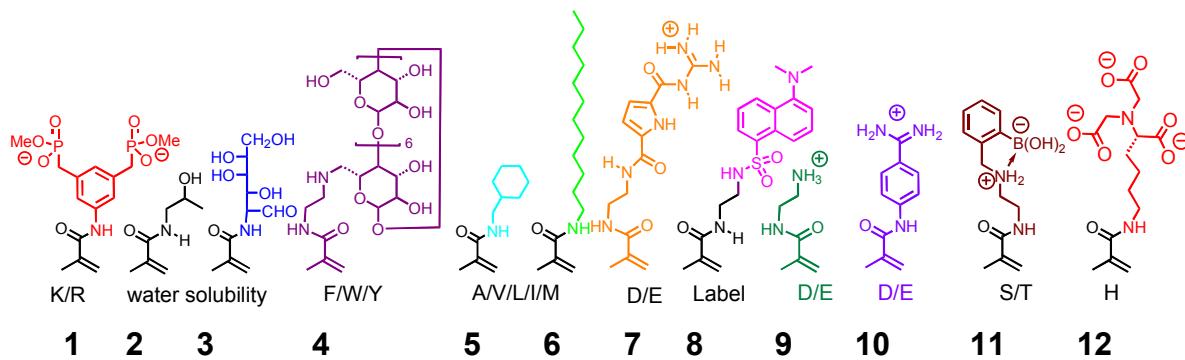


## 3 Durchführung und Ergebnisse

### 3.1 Polymer- Design

Eine selektive künstliche Erkennung von Proteinoberflächen kann neben der medizinischen Relevanz auch für die Affinitätschromatographie verwendet werden. Durch das „Prinzip der Multivalenz“ ist es möglich gezielt eine Bindungsverstärkung zwischen zwei Molekülen zu erreichen. Dabei bilden die Bindungspartner kooperativ multiple Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen, die basierend auf schwachen nichtkovalenten Bindungen reversibel sind. Multi- und polyvalente Wechselwirkungen spielen eine entscheidende Rolle bei Erkennungsprozessen, wie z.B. bei der Oberflächenerkennung von Proteinen, welche in der Arbeitsgruppe *Schrader* als Konzept der Kombination aminosäurespezifische Haftmonomere durch Polymerisation verfolgt wird. In den letzten Jahren wurde bereits eine Vielzahl von Bindungsmotiven etabliert.<sup>[83],[84],[99],[100]</sup> Es wurde gezeigt, dass die Kombination einiger weniger Haftmonomere mit unterschiedlicher Spezifität für Aminosäure-Seitenketten bei der einfachen radikalischen Copolymerisation zu neuen Materialien mit hoher Proteinaffinität (bis zu  $K_d$ -Werten von 25 nM) und teilweise erstaunlicher Proteinselektivität führen (Lysozym:Cytochrom C ~ 100:1).<sup>[84]</sup> Enzyme konnten mit solchen Materialien reversibel an- und abgeschaltet werden. Aufgrund der interessanten potenziellen Anwendung als Reinigungsmethode für rekombinante Proteine wurde bereits ein entsprechendes Patent angemeldet.<sup>[57]</sup>

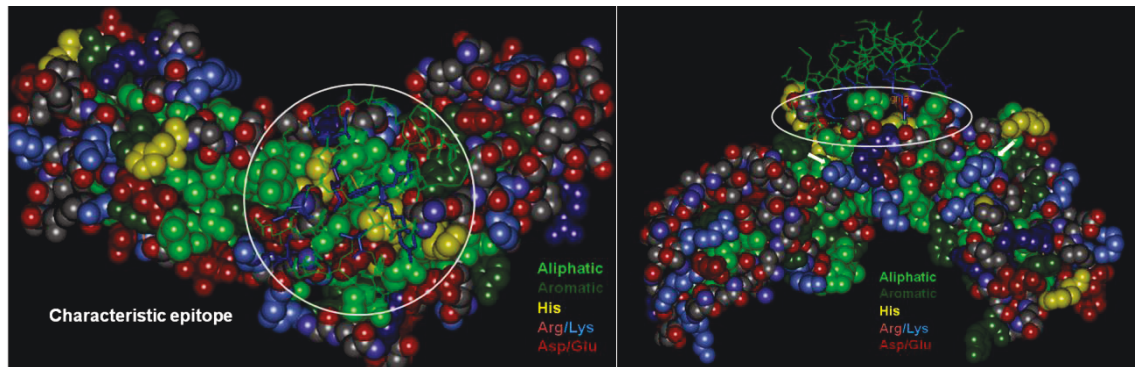
**Abbildung 3.1.1** gibt einen repräsentativen Überblick über die wichtigsten Monomerbausteine. Einige dieser Verbindungen dienen als Sonden für bindende Wechselwirkungen mit basischen (K/R), sauren (D/E), aromatischen (F/W/Y) oder hydroxylhaltigen (S/T) Aminosäuren sowie als Fluoreszenzlabel (Dansyl).



**Abb. 3.1.1:** Haftmonomere auf Methacrylamid-Basis für proteinogene Aminosäuren auf und um die Protein A-Bindungsstelle auf Immunglobulinen. Die Spezifität der Monomere wird über den Buchstaben-Code für proteinogene Aminosäuren dargestellt.

### 3.1.1 Protein A/IgG-Interface

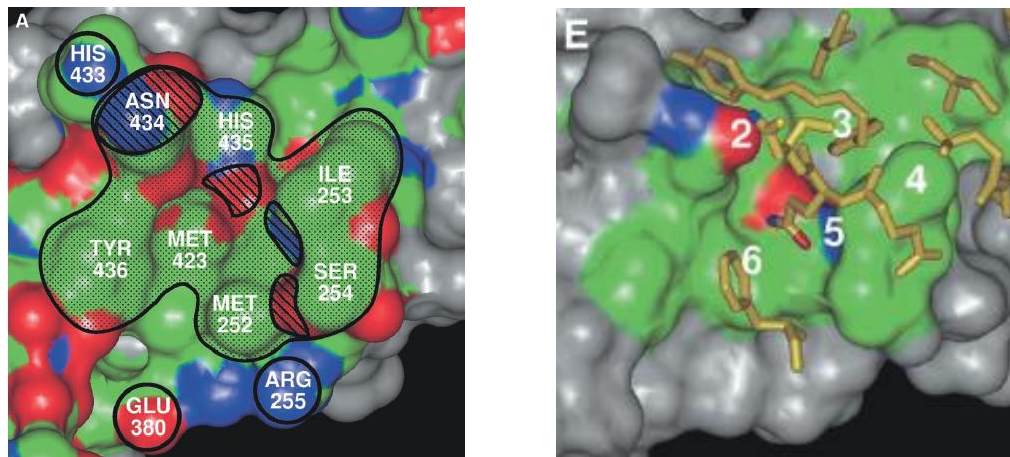
Aus einer Vielzahl potenter Haftmonomere müssen durch „rationelles Design“ einige wenige Kandidaten sondiert werden, die den größten Erfolg versprechen. Dafür müssen die Proteinoberfläche und das Protein/Protein-Interface genauer analysiert werden. Dies geschah anhand der Kristallstruktur des Protein A/IgG-Komplexes. Eine Analyse der für die molekulare Erkennung kritischen Aminosäurereste und ihrer Verteilung auf und um die Protein A-Bindungsstelle führte zur Auswahl bzw. Neusynthese von geeigneten Haftmonomeren. Rekombinante Antikörper dürfen im Capture-Schritt auf keinen Fall an ihrer Antigenerkennungsstelle, den hypervariablen Loops, beschädigt werden. Um alle damit verbundenen Problemen von vornherein zu umgehen, wurde nach einem Polymer gesucht, welches an derselben Stelle an den Antikörper bindet wie das etablierte Protein A. Dazu diente die Kristallstruktur des Protein A/IgG Interfaces als Grundlage (vgl. **Abbildung 3.1.2**).



**Abb. 3.1.2:** Kristallstruktur vom Fc-Teil des Immunglobulins (Kugeln) mit der B-Domäne von Protein A (grüne Stäbchen in weißem Kreis). Die kritischen Aminosäuren der Kontaktstelle sind farbig markiert. Links: Aufsicht; rechts: Seitenansicht.<sup>[58]</sup>

Auffällig ist die zentrale Lokalisation von aromatischen und hydrophoben Aminosäuren (grün) sowie von wenigen Histidinen (gelb) im Bindungsepitop des IgG, während sich ein Saum von kationischen Aminosäuren (blau) knapp außerhalb um die Bindungsstelle herumzieht. Diese werden dazu genutzt, um weitreichende ionische Wechselwirkungen mit peripheren anionischen Aminosäuren des Protein A-Gastes auszubilden.

Ein Blick direkt auf das Bindungsepitop (vgl. **Abbildung 3.1.3**) zeigt die Topologie der an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Sehr gut zu erkennen ist der überwiegend hydrophobe Anteil dieser Kontaktfläche (grau schattiert), die Wechselwirkungen durch Wasserstoff-Brückenbindungen (schraffiert), elektrostatische Bindungen (eingekreist), sowie die Beteiligung der wichtigsten Aminosäuren des Protein A (gelb).



**Abb. 3.1.3:** Topologie des Bindungsseptops auf dem Fc-Teil von IgG. Sauerstoff- und Stickstoff-Atome sind rot bzw. blau, Schwefel- und Kohlenstoff-Atome sind grün dargestellt. Links: Protein A-Bindungsseptop (grau schattiert), Wechselwirkungen durch Wasserstoff-Brückenbindungen (schraffiert). Rechts: Wechselwirkungen zu den wichtigsten Aminosäuren des Protein A: (2) Wasserstoff-Brückenbindung zu Asn-434, (3) hydrophobe Wechselwirkungen zu His-435, (4) hydrophobe Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Kern Ile-253 und Ser-254, (5) Wasserstoff-Brückenbindung zu Ile-253, (6) hydrophobe Wechselwirkung mit Met-252.<sup>[59]</sup>

Protein A besteht aus 5 Domänen oder Fragmenten, die jeweils aus ca. 58 Aminosäuren aufgebaut sind.<sup>[60]</sup> Jede der 5 Domänen verfügt über drei antiparallel angeordnete Helices mit zwei verbrückenden Schleifen. Diese Helices stehen in engem Kontakt miteinander und bilden einen hydrophoben Kern. Insgesamt sind 12 Aminosäuren von Fragment B bei der Bindung zum Fc-Teil von IgG beteiligt.

## Sequenz

													Domäne	AS-Anzahl	
	A	QHDEA	QQNAF	YQVLN	MPNLN	ADQRN	GFIQS	LKDDP	SQSAN	VLAEA	QKLND	SQAPK	E	56	
A	DAQQN	NFNKD	QQSAF	YEILN	MPNLN	EAQRN	GFIQS	LKDDP	SQSTN	VLAEA	KKLNE	SQAPK	D	61	
A	D	N	NFNKE	QQNAF	YEILN	MPNLN	EEQRN	GFIQS	LKDDP	SQSAN	LLSEA	KKLNE	SQAPK	A	58
A	D	N	KFNKE	QQNAF	YEILH	LPNLN	EEQRN	GFIQS	LKDDP	SQSAN	LLAEA	KKLND	AQAPK	B	58
A	D	N	KFNKE	QQNAF	YEILH	LPNLN	EEQRN	GFIQS	LKDDP	SVSKE	LLAEA	KKLND	AQAPK	C	58
V	D	N	KFNKE	QQNAF	YEILH	LPNLN	EEQRN	AFIQS	LKDDP	SQSAN	LLAEA	KKLND	AQAPK	Z	58
Helix 1					Helix 2					Helix 3					

**Abb. 3.1.4:** Aminosäuresequenz von Protein A. Rot markierte Aminosäuren sind Veränderungen in Bezug auf Domäne B. <sup>[61], [63]</sup>

## An IgG bindende Aminosäuren der Domäne B

120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	Art der Wechselwirkung bzw. Bindung
ADNK	NKEQQ	NAFY	ILHLP	NLNEE	QRNGF	IQSLK	DDPSQ	SANLL	AEAKK	LNDAQ	APK	Hydrophobe WW
ADNKF	NKEQQ	NAFY	ILHLP	NLNEE	QRNGF	IQSLK	DDPSQ	SANLL	AEAKK	LNDAQ	APK	Wasserstoffbrückenbindungen
ADNKF	NKEQQ	NAFY	ILHLP	NLNEE	QRNGF	IQSLK	DDPSQ	SANLL	AEAKK	LNDAQ	APK	Ionische Bindungen
ADNKF	NKEQQ	NAFY	ILHLP	NLNEE	QRNGF	IQSLK	DDPSQ	SANLL	AEAKK	LNDAQ	APK	Elektrostatische WW im Vakuum

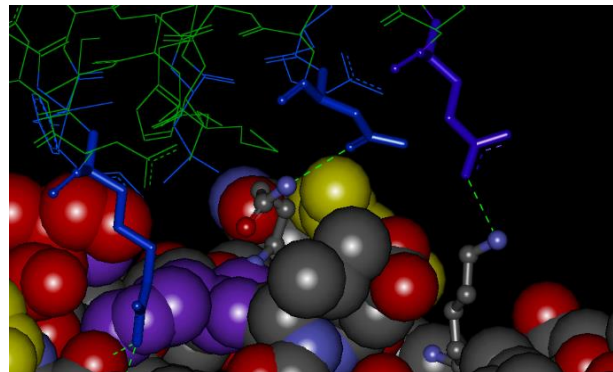
Helix 1

Helix 2

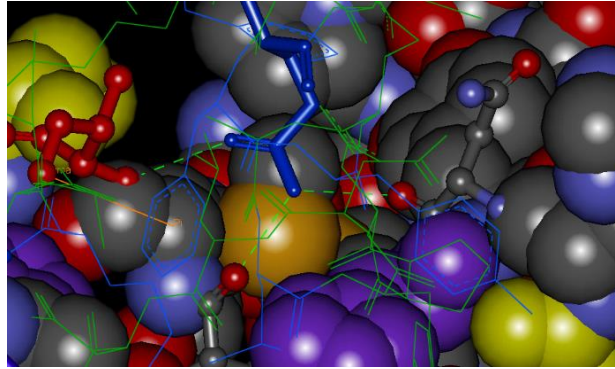
Helix 3

**Abb. 3.1.5:** Aminosäuresequenz von Fragment B. Rot markierte Aminosäuren wechselwirken mit IgG, gelb markierte Aminosäure wechselwirkt nur über die Seitenkette. <sup>[61], [63]</sup>

Die Protein A-Bindung besteht aus hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und zwei Salzbrücken. Phe-124, Phe-132, Tyr-133, Leu-136, Ile-150 und die Seitenkette von Lys-154 bilden den Hauptteil des hydrophoben Effekts von Protein A. Die Wasserstoffbrückenbindungen werden gebildet von Phe-132, Tyr-133, Gln-128, Asn-130, Asn-147. Ionenpaarbindungen werden gebildet von Arg-146 und Lys-154, welches an ein Sulfation bindet. Elektrostatische Wechselwirkungen im Vakuum gehen hauptsächlich von Gln-129, Asn-130, Arg-146 und Lys-154 aus (vgl. **Abbildung 3.1.5**).

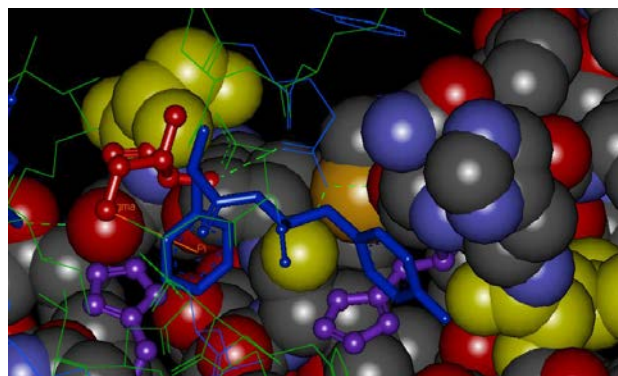


**Abb. 3.1.6:** Ionische Wechselwirkungen zwischen Asparagin (Protein A) und Lysin (IgG), bzw. Asparagin (Protein A) und Glutamin (IgG).



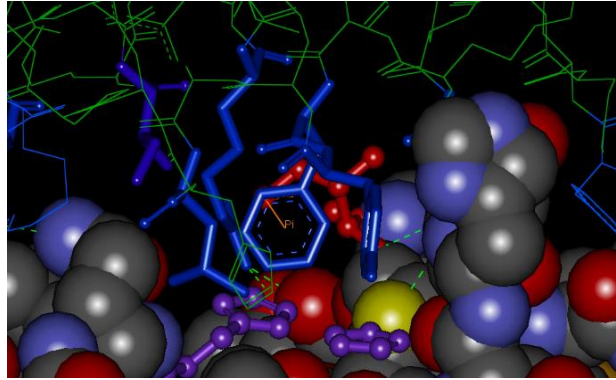
**Abb. 3.1.7:** Ionische Wechselwirkungen zwischen Glutamin (Protein A) und den Carbonylgruppen von Asparagin und Leucin bzw. der Aminogruppe von Isoleucin.

Einen zentralen Beitrag zur Antikörper-Bindung liefert zusätzlich das Phenylalanin-Tyrosin Dipeptidmotiv von Protein A. Dieses Dipeptidfragment bildet dispersive und hydrophobe Wechselwirkungen zu Leucin- und Isoleucinresten auf der Oberfläche von IgG der Subklassen 1, 2 und 4 aus. IgG<sub>3</sub> wird von dem Dipeptidmotiv nicht gebunden, was darauf zurückzuführen ist, dass His-435 in IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub> gegen Arginin ausgetauscht wurde, was zu einer erhöhten Hydrophilie führt. Dies ist unter anderem ein Grund, dass Protein A nur an den Subklassen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub> bindet, jedoch nicht an IgG<sub>3</sub>.<sup>[62]</sup> Aufgrund dieser Tatsachen wurden entsprechende Monomere zur Erkennung aromatischer und aliphatischer, hydrophober Aminosäuren entwickelt und ein möglichst einfaches Mimetikum für das Aminosäurepaar Phe-Tyr. Diese sollten mit den bereits vorhandenen sehr effizienten Haftmonomeren auf Bisphosphonatbasis für die Lysin- bzw. Argininerkennung kombiniert werden.



**Abb. 3.1.8:** „ $\sigma$ - $\pi$ “ Interaktion des Dipeptids (Phenylalanin, blau) mit dem Isoleucin (rot) des IgG.



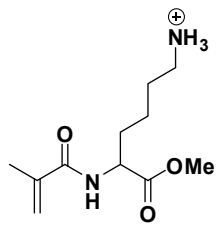


**Abb. 3.1.9:** Hydrophobe Wechselwirkungen des Dipeptids Phe132-Tyr133 (blau) mit den Aminosäuren Isoleucin und Leucin auf der IgG – Proteinoberfläche.

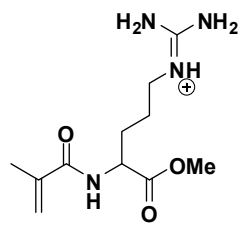
### 3.1.2 Epitop-spezifische Monomere

Folgende neue Monomere wurden innerhalb dieser Arbeit, basierend auf den Erkenntnissen dieser Kristallstruktur, in kurzen Synthesen hergestellt: Als kationische Monomere wurden das so genannte Lysin-Monomer (**13**), das Arginin-Monomer (**14**) und das Diamin-Monomer (**15**) synthetisiert. Diese sollen anionische Aminosäuren des IgG im Zentrum der Protein A/IgG-Bindungsstelle über ionische Wechselwirkungen erkennen und mittels H-Brücken binden.

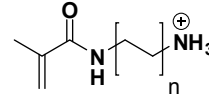
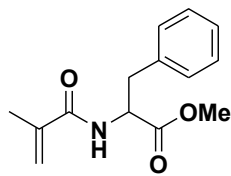
Als aromatische bzw. hydrophobe Monomere wurden das Phenylalanin-Monomer (**16**), das Anilin-Monomer (**17**), das Alanin-Monomer (**18**) und das Cyclohexyl-Monomer (**19**) synthetisiert. Diese Monomere werden benötigt, um die zahlreichen hydrophoben Aminosäuren im Zentrum der Protein A-Bindungsstelle über hydrophobe Wechselwirkungen zu binden.

**Kationische Monomere**

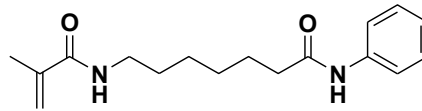
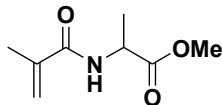
Lys-Monomer

**13**

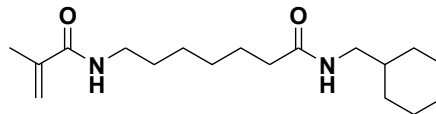
Arg-Monomer

**14****15****Aromatische und hydrophobe Monomere**

Phe-Monomer

**16****17**

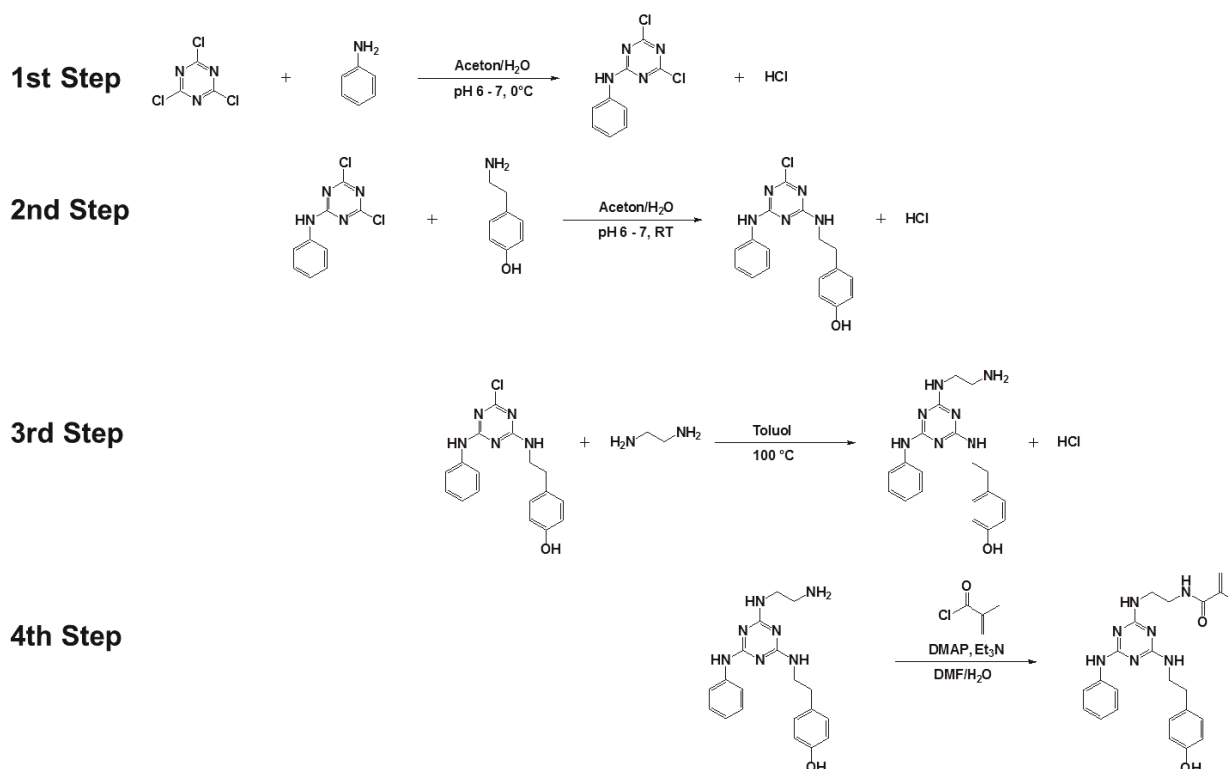
Ala-Monomer

**18****19****Abb. 3.1.10:** Übersicht der epitop-spezifischen Monomere.

Als Spezialmonomer wurde außerdem ein Mimetikum für die beiden aromatischen Reste Phe-132-Tyr-133 in Protein A synthetisiert. Dieses Dipeptid wird bei der IgG-Bindung in der Antikörperoberfläche vergraben und leistet dadurch einen starken Beitrag zur Gesamtbindungsenergie. Seine mimetische Eigenschaft war bereits aus der Literatur durch Lowe et al. bekannt. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.]



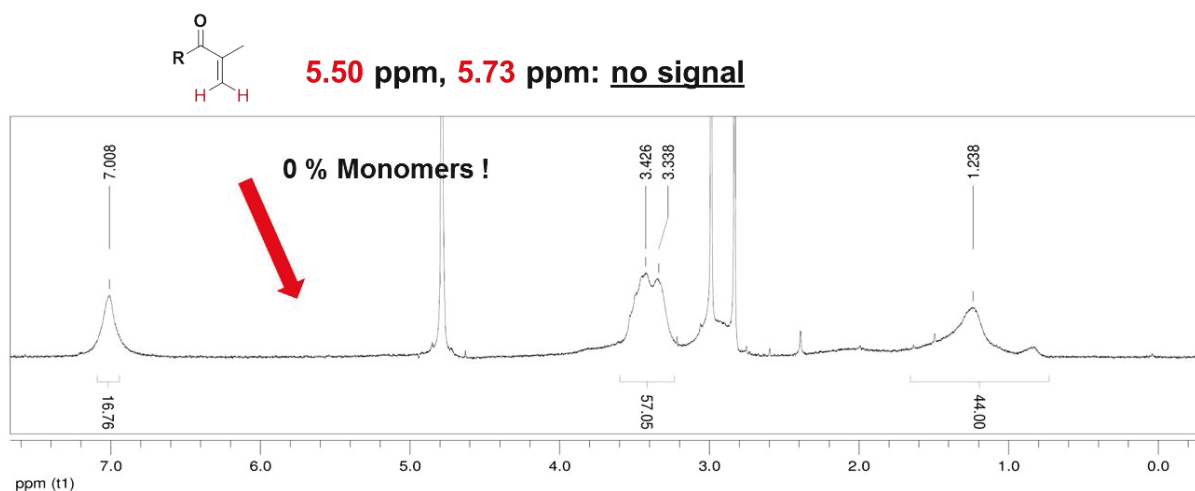
Das folgende Syntheschema beschreibt die 4-stufige ApA-Synthese:



**Abb. 3.1.11:** Syntheschema des ApA-Monomers auf Basis eines Triazin-Ringes.

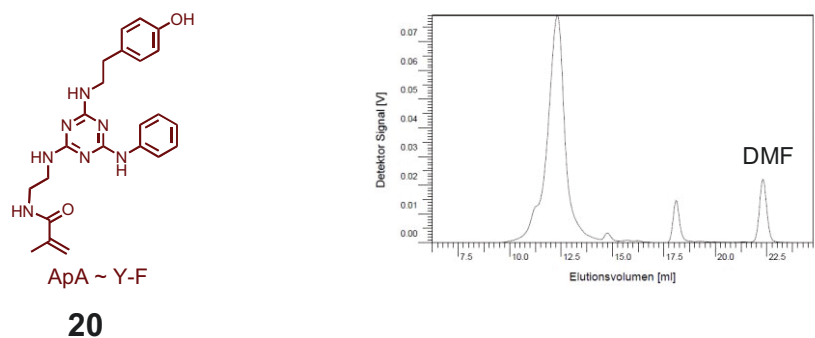
Bei dieser Synthese werden sukzessive alle Chloratome von Trichlortriazin durch Anilin, Tyramin und Ethylendiamin nucleophil ersetzt; im letzten Schritt wird Methacrylsäurechlorid an die freie Aminogruppe gekuppelt, wodurch das methacrylamidbasierte ApA-Monomer entsteht (vgl. **Abbildung 3.1.11**).

Dieses Monomer wurde in der oben beschriebenen vierstufigen Synthese mit einer Reinheit von >98% synthetisiert und mit etablierten Monomeren wie z.B. dem Bisphosphonat-, dem Dansyl- und dem Glucosyl-Monomer copolymerisiert. Den vollständigen Einbau dieses Monomers in neue Copolymere zeigt u. a. das folgende NMR-Spektrum des Polymers **46** an, welches keine Doppelbindungsprotonen von Restmonomeren bei 5-6 ppm aufweist.



**Abb. 3.1.12:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Polymer **46** mit der ApA-Einheit (1 Bisphosphonat-Monomere, 1 Glucosyl-Monomer, 1 ApA-Monomer, 0.5 Dansyl-Monomer).

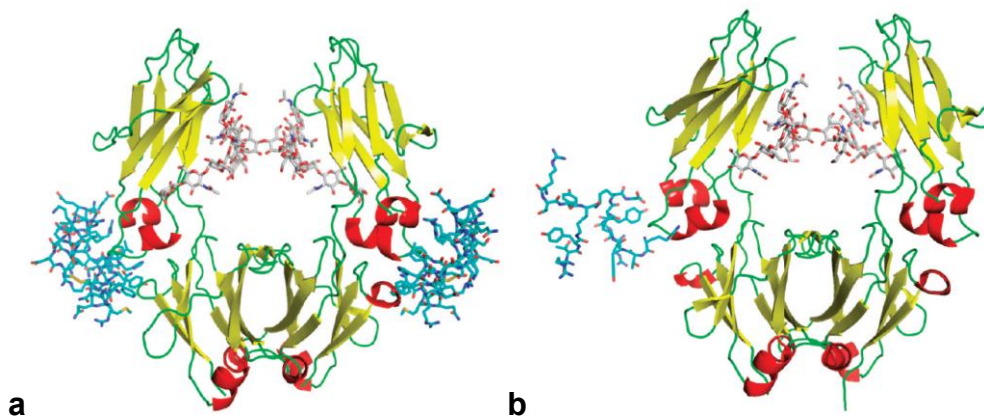
Durch anschließende Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) konnten Molekulargewichte der Polymere von 164 kDa bis 252 kDa ermittelt werden. Im Folgenden ist das GPC-Chronogramm des Polymers **46** abgebildet (Abbildung 3.1.13), welches radikalisch mit einer Monomerzusammensetzung von 1 Äquivalent BP-, 1 ApA-, 1 Glucosyl- und 0.5 Dansyl-Baustein copolymerisiert wurde und dabei ein Molekulargewicht von 185 kDa erreichte.



**Abb. 3.1.13:** Links: ApA-Monomer (**20**) als Tyr-Phe-Mimetikum; rechts: GPC-Diagramm des Copolymers mit der Zusammensetzung: 1 Bisphosphonat-Monomere, 1 Glucosyl-Monomer, 1 ApA-Monomer und 0.5 Dansyl-Monomer.

### 3.1.3 Protein A-mimetisches Monomer

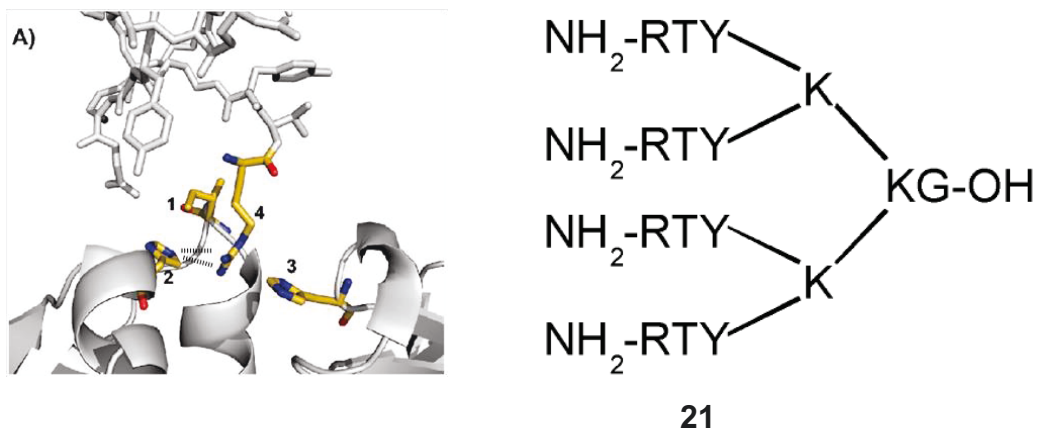
Ein weiterer Weg, der eingeschlagen wurde, jedoch nicht zum Erfolg führte, war das Überführen des YTR-Tripeptids von *Fassina* et al., als IgG Erkennungseinheit, in ein Haftmonomer auf Methacrylsäurebasis. Bereits zu Anfang unserer Arbeiten war eine Untersuchung zur Generation von Dendrimeren mit IgG-Affinität bekannt. Diese Arbeiten führten zwar durch Multiplikation eines YTR-Motivs zu einfachen lysinbasierten Dendrimeren mit guter Affinität für die Protein A-Bindungsstelle, konnten jedoch aus verschiedenen verfahrenstechnischen Gründen nicht als Trennmaterialien für den Capture-Schritt weiterentwickelt werden. Die Information über eine besonders effiziente Erkennung des YTR-Motivs durch die Protein A-Bindungsstelle (vgl. **Abbildung 3.1.14b**) wurde zur Entwicklung von neuartigen Haftmonomeren eingesetzt, führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg.



**Abb. 3.1.14:** Links: Kristallstruktur des Komplexes aus dem Fc-Fragment (IgG) mit der B-Domäne von Protein A; rechts: Kristallstruktur des Komplexes aus dem Fc-Fragment (IgG) mit dem Protein A mimetischen Dendrimer. <sup>[64]</sup>

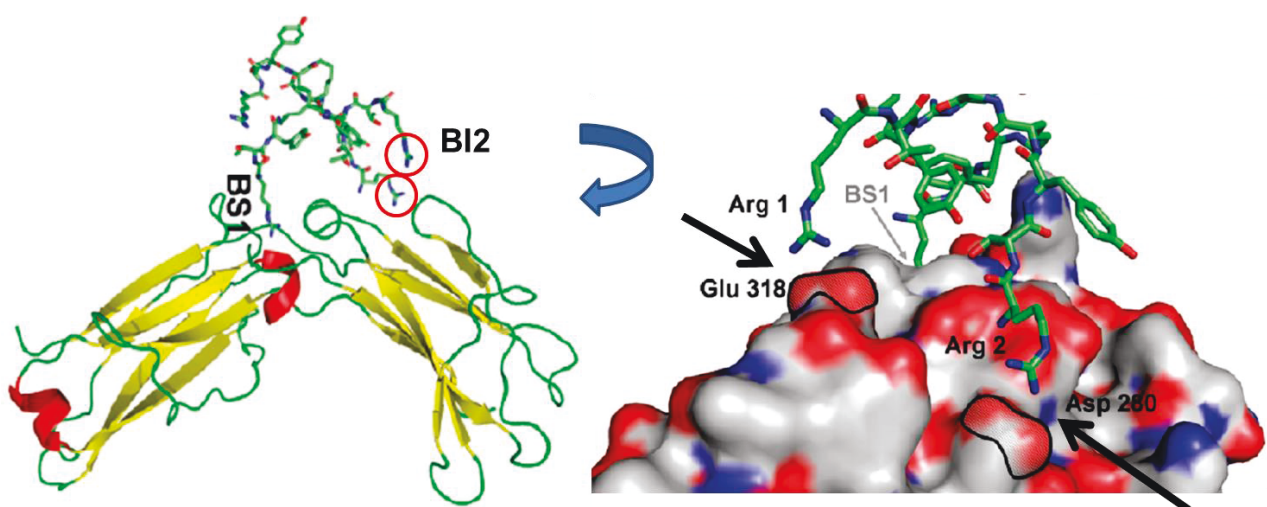
**Abbildung 3.1.14b** zeigt die Kristallstruktur des Komplexes bestehend aus dem Fc-Fragment des IgG mit dem Dendrimer von *Fassina* et al., welches an dem gleichen C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3 Interface bindet wie das Protein A und in der Lage ist diese Protein A Bindungsstelle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgreich zu blockieren. Die Kristallstruktur zeigt eine entscheidende Wechselwirkung zwischen dem Dendrimer und der Protein A Bindungsstelle, bestehend aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Guanidinium-Gruppe des terminalen Arginins (Dendrimer) und dem Imidazol-Rings eines Histidins-Restes in der hydrophoben Tasche des IgG (vgl.

**Abbildung 3.1.15).** Gebildet wird diese hydrophobe Tasche aus den drei Aminosäuren His-310, His-435 und Ile-253.



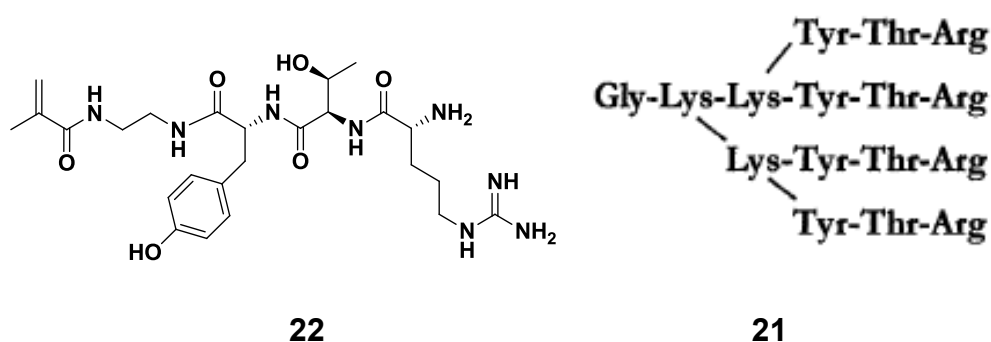
**Abb. 3.1.15:** Links: Kristallstruktur der hydrophoben Tasche des IgG in Wechselwirkung mit dem Dendrimer; rechts: schematische Darstellung des Dendrimers (21) nach Fassina.<sup>[64]</sup>

MD (Molecular Modelling) Simulationen des Komplexes zeigen zwei weitere Interaktionen des Dendrimers mit der Protein A Bindungsstelle. Es wechselwirken jeweils ein terminales Arginin mit Glu-318 bzw. Asp-280, indem sich das Dendrimer chaperonartig auf das Bindungsepitop setzt.



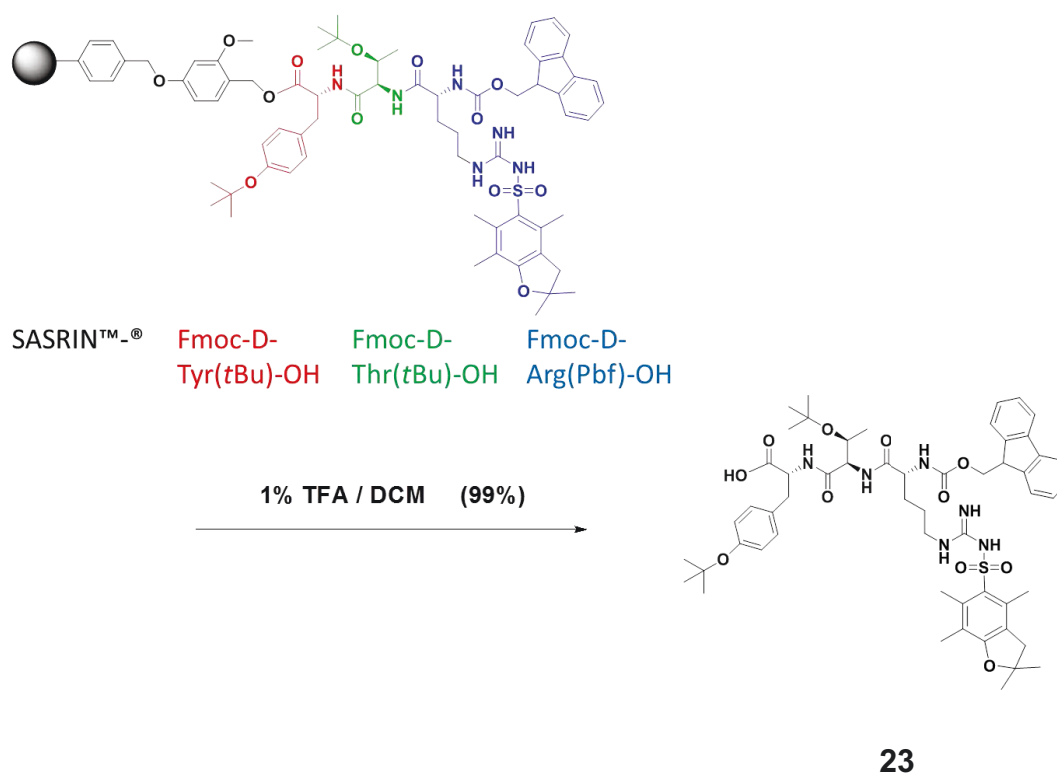
**Abb. 3.1.16:** MD Simulation des Dendrimer/IgG Komplexes.<sup>[64]</sup>

Es wurden mehrere Versuche unternommen das angestrebte Tripeptid-Monomer (**22**) in Anlehnung an die Tyr-Thr-Arg-Sequenz des bereits bekannten „Protein A mimetic peptide dendrimer“ (**21**) zu synthetisieren. Besonders schwierig gestaltete es sich einen Weg zu finden, den Monomerbaustein *N*-(2-aminoethyl)methacrylamid an das C-terminale Ende des Tripeptids zu koppeln, da hierfür sämtliche funktionelle Gruppen, ausgenommen die Carbonsäurefunktion am C-terminus, in geschützter Form vorliegen müssen.



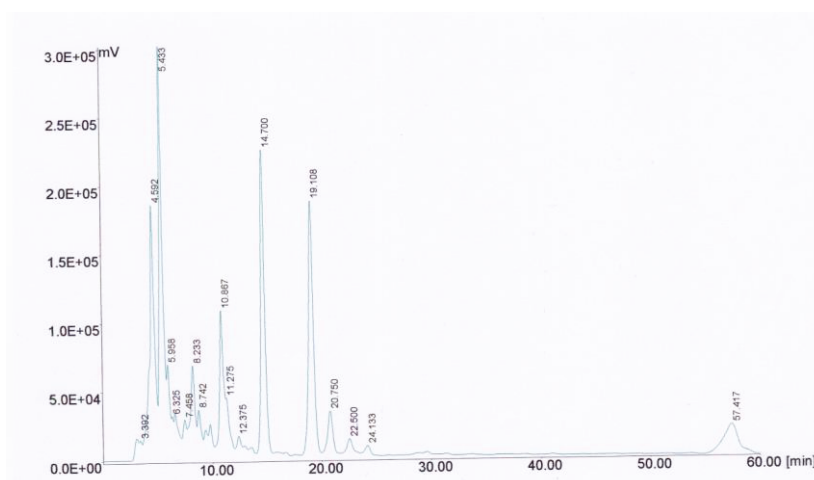
**Abb. 3.1.17:** Strukturformel des designten YTR-Monomers (**22**); Schematische Darstellung des Dendrimers (**21**), bestehend aus einem tetrameren Tripeptid der Sequenz Arg-Thr-Tyr, welche an einem zentralen Polylysine-Kern synthetisiert wurde.<sup>[64]</sup>

Eine Möglichkeit das komplett geschützte Tripeptid herzustellen bietet die Synthese an fester Phase, am Sasrin-Harz. Die Besonderheit des Sasrin-Harz liegt darin, dass nach vollständiger Synthese am Synthesizer das Peptid unter milden Bedingungen (1% TFA in DCM) vom Harz getrennt werden kann und auf diese Weise sämtliche Schutzgruppen erhalten bleiben. Dies unterscheidet das Sasrin-Harz von anderen Harzen, wie z.B. dem Wang-Harz, bei dem drastischere Bedingungen gewählt werden müssen, um das Peptid vom Harz zu spalten.



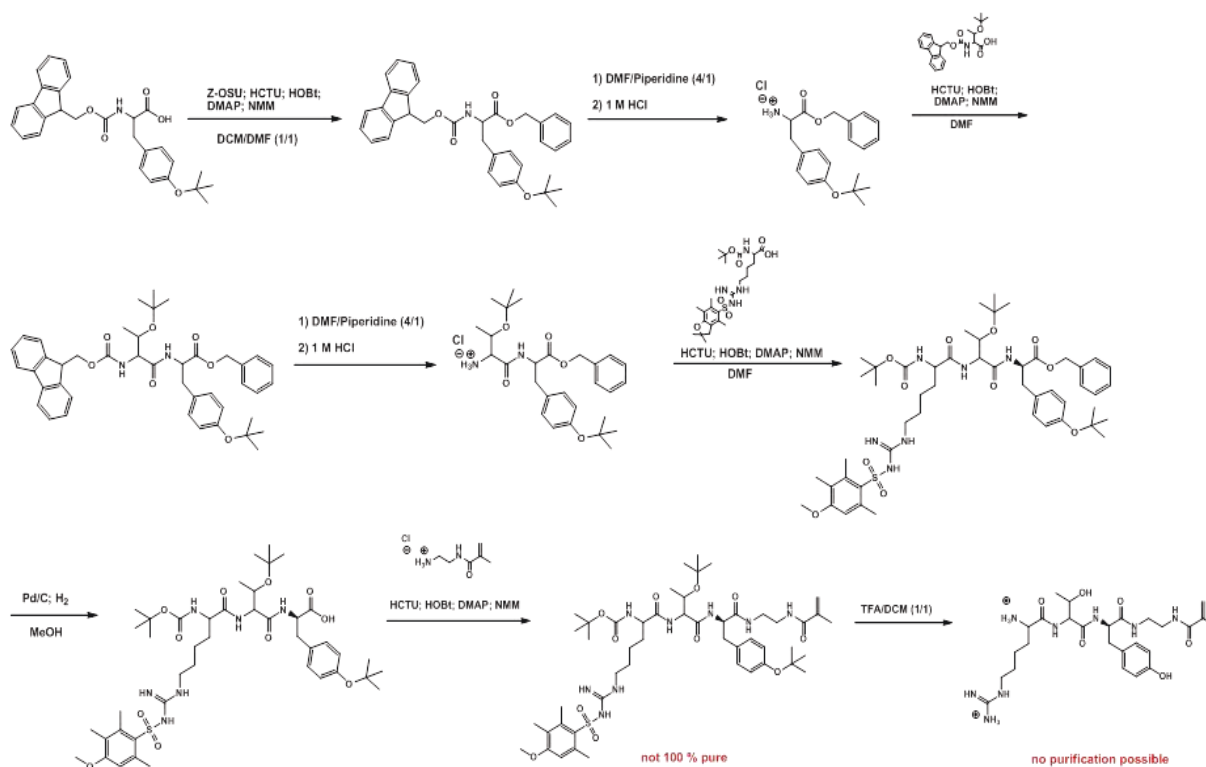
**Abb. 3.1.18:** Festphasensynthese des YTR-Tripeptids (**23**) am Sasrin-Harz.

Leider ergaben sämtliche Umsätze Produktgemische (siehe HPLC-Spektrum des YTR-Tripeptids (**23**)), so dass auf eine Synthese des YTR-Monomers in Lösung zurückgegriffen wurde, welche als deutlichen Nachteil geringere Ausbeuten und höheren Zeitaufwand im Vergleich zu einer Festphasensynthese mit sich bringt.



**Abb. 3.1.19:** HPLC-Spektrum des YTR-Tripeptids (**23**) nach Abspaltung vom Sasrin-Harz.

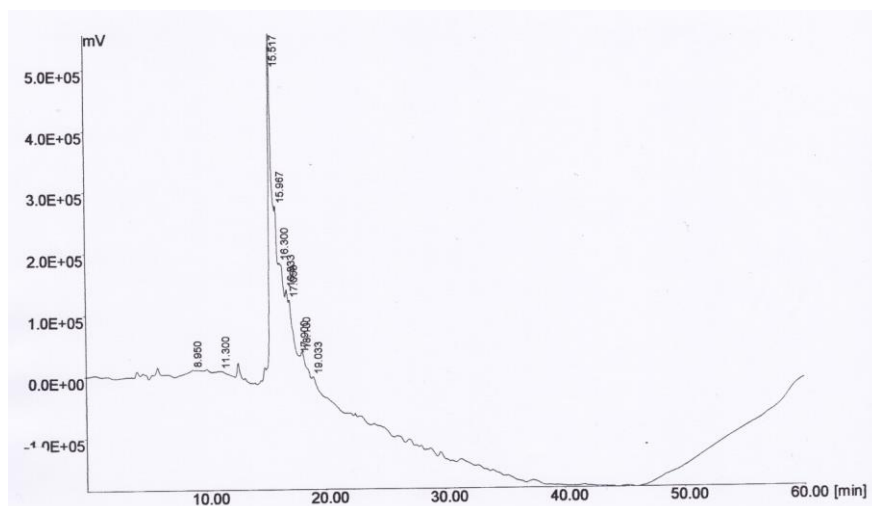
Die Synthese in Lösung verlief über 8 Stufen, wobei sich Kupplung und anschließende Entschützung abwechselten. Gestartet wurde mit der Aminosäure Phenylalanin (Fmoc-Phe(*tert.* Butyl)-OH).



24

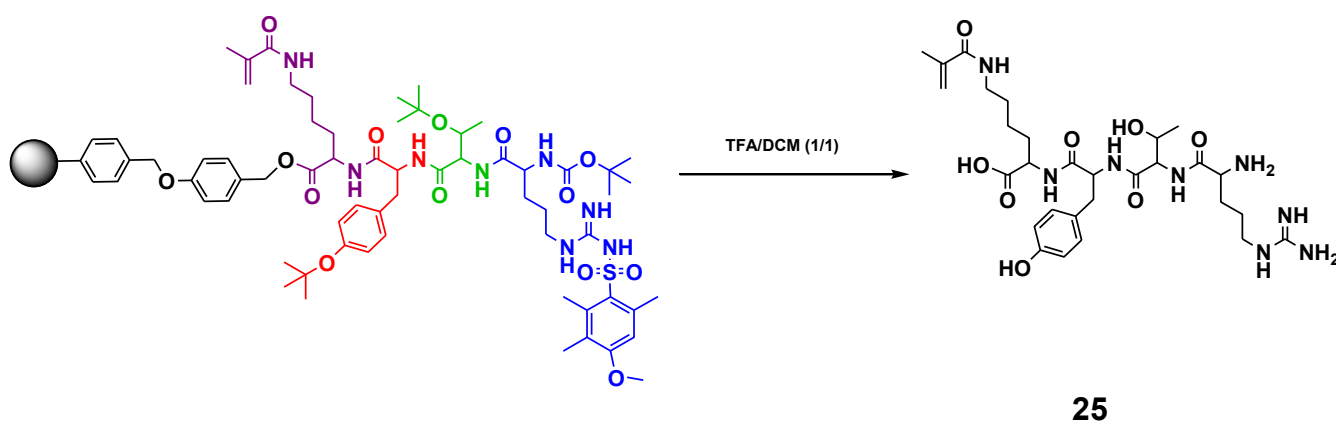
Abb. 3.1.20: Syntheseweg des YTR-Monomers (24) in Lösung.

Der letzte Kupplungsschritt mit *N*-(2-aminoethyl)methacrylamid erwies sich allerdings als kompliziert, da es nicht möglich war das Produkt säulenchromatographisch zu reinigen, aufgrund von schwer voneinander trennbaren Mischfraktionen. Die erhoffte Reinigung durch Ausfällen des entschützten YTR-Monomers (24) aus TFA blieb aus, es konnten nur Produktgemische erhalten werden. Dies zeigte deutlich das aufgenommene HPLC-Spektrum.



**Abb. 3.1.21:** HPLC-Spektrum des entschützten YTR-Monomers (**24**).

Da sowohl die Festphasensynthese als auch die Synthese in Lösung zu keinem Ergebnis führten, musste dieses Konzept erneut überdacht werden. So entstand die Idee, das YTR-Tripeptid um eine Aminosäure (Lysin) zu erweitern. Die Einführung der Aminosäure Lysin ermöglichte die Synthese an konventioneller fester Phase (Wang-Harz), die aufgrund ihrer höheren Ausbeute der Lösungssynthese überlegen ist. So wurde das KYTR-Tetrapeptid (**25**) an der festen Phase hergestellt.

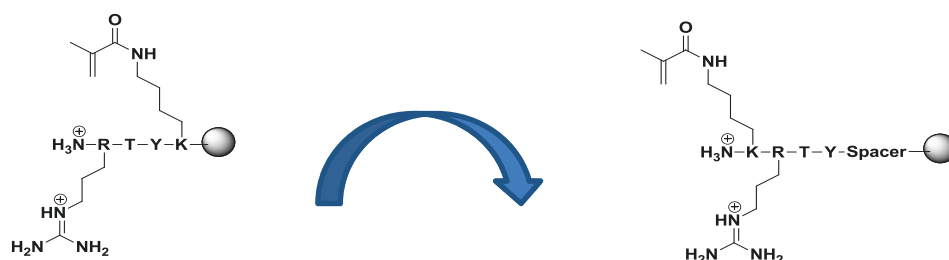


**Abb. 3.1.22:** Festphasensynthese des KYTR-Monomers (**25**).

Hierzu wurde als erste Aminosäure Alloc-geschütztes Lysin (Fmoc-Lys(Alloc)-OH) an Wang-Harz gekuppelt. Anschließend wurden Tyrosin, Threonin und Arginin nach der Fmoc-Strategie angeknüpft. Im nächsten Schritt gelang die selektive Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe am C-terminalen Lysin, welches im darauffolgenden Schritt mit

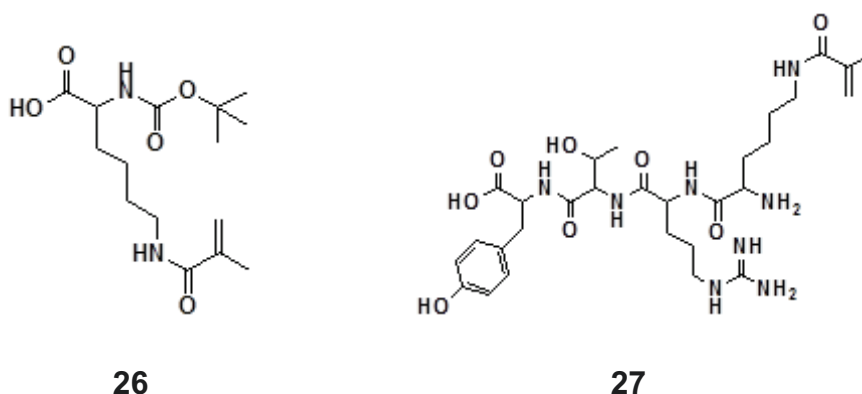


Methacrylsäurechlorid verlängert werden sollte. Leider ergaben auch bei dieser Methode sämtliche Umsätze Produktgemische. Aus diesem Grund wurde beschlossen, die vierte Aminosäure Lysin mit der bereits vorhandenen polymerisierbaren Methacryl-Einheit an den *N*-Terminus des Arginins zu koppeln.



**Abb. 3.1.23:** Schematische Darstellung der Festphasensynthesen.

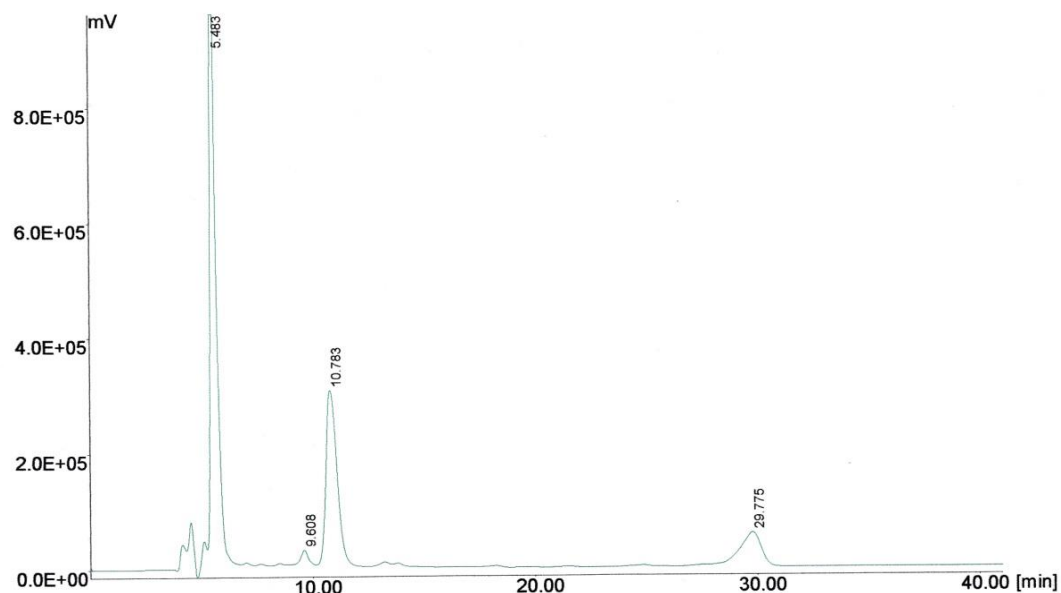
Daraus entstand als neues Synthesziel das Tetrapeptid (**27**), welches in der Sequenz YTRK dem KYTR-Tetrapeptid (**25**) nahesteht.



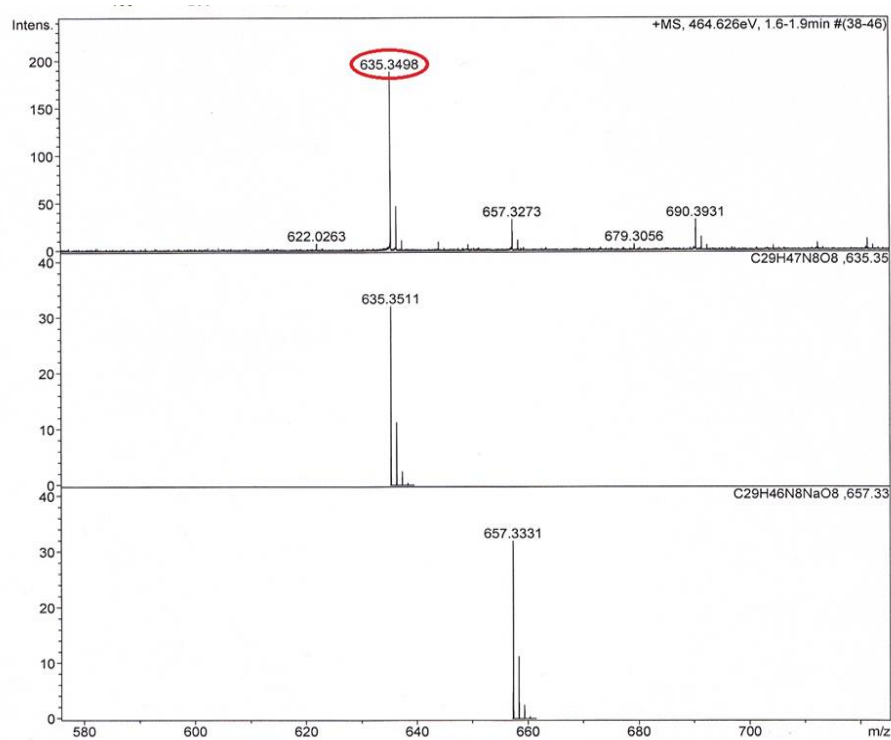
**Abb. 3.1.24:** Strukturformeln des eingesetzten Lysin-Monomers (**26**) und des YTRK-Monomers (**27**).

Hierzu wurde zunächst das Lysin-Monomer (**26**) durch zwei-stufige Synthese in Lösung hergestellt. Dieses wurde anschließend in der Festphasensynthese als *N*-terminaler Aminosäurebaustein des Tetrapeptids eingesetzt. Im letzten Syntheseschritt wurde das komplett entschütztes Tetrapeptid-Monomer (**27**) durch

Behandeln mit 50%iger TFA in 70%iger Reinheit erhalten (siehe HPLC-Chromatogramm und MS-Analyse).



**Abb. 3.1.25:** HPLC-Chromatogramm des Tetrapeptid-Monomer-Rohprodukts (27).

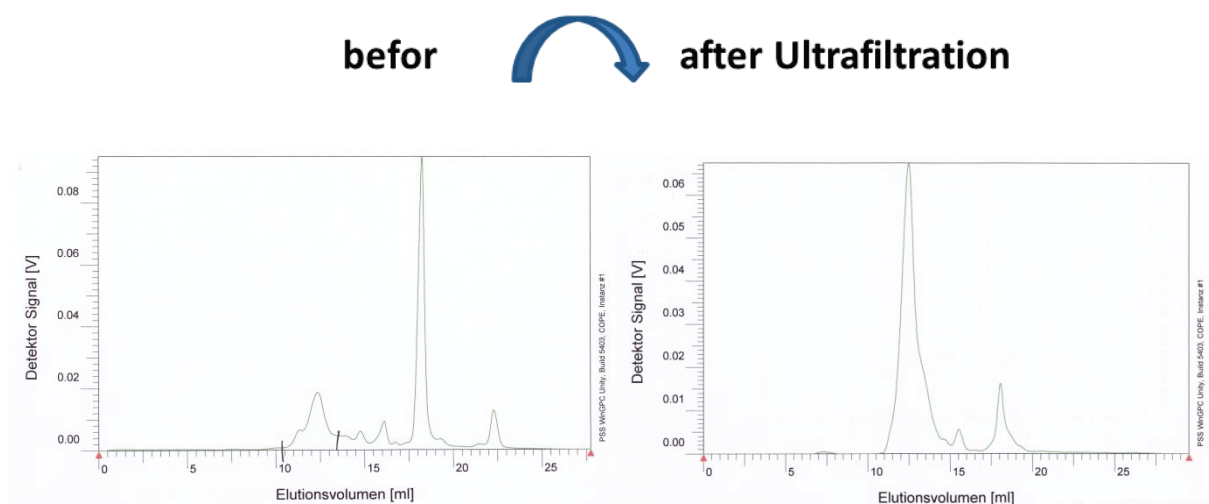


**Abb. 3.1.26:** ESI-Massenspektrum des Tetrapeptid-Monomers (27).

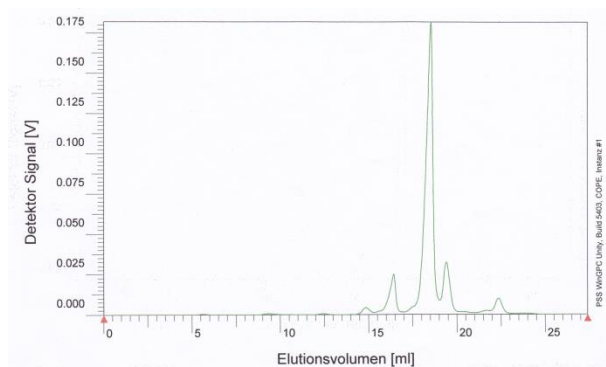
Mit Hilfe eines neu entwickelten ELISA-Tests wurden die Tetrapeptid-Monomere **(25)** und **(27)** auf ihre IgG-Affinität hin untersucht. Das Ergebnis dieser Messungen ergab für beide Monomere eine Erniedrigung der optischen Dichte um 18% für Monomer **(25)** bzw. 15% für Monomer **(27)**, was einer Dissoziationskonstante von 0.25 mmol/L für Monomer **(25)** und 0.3 mmol für Monomer **(27)** ergibt. Für beide Messungen wurden dieselben Konzentrationen an Bindungspartnern verwendet: 70 nM IL8 Antikörper, 1  $\mu$ M gebundenes Protein A und 8  $\mu$ M Monomer. Leider verliefen sämtliche Copolymerisationsversuche bisher sehr unvollständig ab (nicht abtrennbare Monomerrückstände >50%). Das Projekt wurde daher aufgrund der kosten- und arbeitsintensiven Synthese des Monomers nicht weiter verfolgt.

### 3.2 Optimierung der Polymerisationsbedingungen

Durch systematische Variation der Polymerisationsbedingungen wurde eine Methode zur Copolymerisation im Mikro- (10-50 mg) und Minimaßstab (50-500 mg) entwickelt, die in DFM-Wasser-Gemischen mit hohen Ausbeuten abläuft. Mit ihrer Hilfe wurde eine diversifizierte Bibliothek an Copolymeren synthetisiert und hinsichtlich ihrer IgG-Affinität getestet. Insgesamt wurden auf diese Weise 44 neue Affinitätspolymere hergestellt, die als Testplattform in Lösung dienen sollten und sich in Ladung und Hydrophilie unterscheiden. Polymerisiert wurde im Mikro- und Mini-Maßstab mit einer Monomergesamtmenge bis zu 60 mg. Es wurden dafür spezielle 1.0 - 1.5 mL verschließbare Glasgefäße und ein entsprechender Thermomixer verwendet. Die Reaktionszeit konnte bei einer Temperaturerhöhung von 60°C auf 70°C auf maximal einen Tag reduziert werden. Dies entspricht einer Zeitersparnis von 6 Tagen im Vergleich zu Vorarbeiten.<sup>[100]</sup> Eine Innovation, welche in dieser Arbeit erstmals eingesetzt wurde, war die anschließende Aufarbeitung durch Ultrafiltration. Hierzu wurden kleine Röhrchen mit Filter für den Einsatz in der Zentrifuge von der Firma Millipore verwendet, mit einer Porengröße von 3,000 NMWL. Diese präparative Ultrafiltration ermöglichte erstmals eine Abtrennung der Monomerrückstände von den Polymeren.

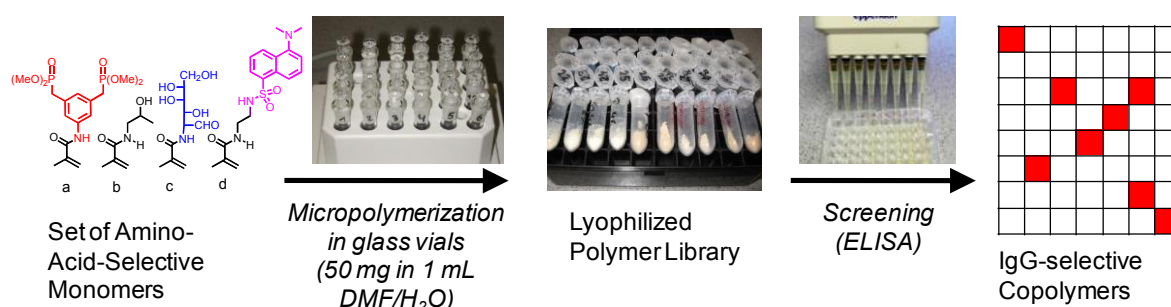


**Abb. 3.2.1:** GPC-Spektren vor (links) und nach (rechts) Ultrafiltration.



**Abb. 3.2.2:** GPC-Spektrum der abgetrennten Monomerrückstände durch Ultrafiltration.

Die gereinigten monomerfreien Polymere wurden anschließend zu farblosen Pulvern lyophilisiert. NMR-Spektren zeigten über ihre NMR-Integrale die Einbauraten im Polymer an sowie die vollständige Abwesenheit von Monomeren (Doppelbindungssignale bei 5-6 ppm). Die Molekulargewichte wurden je nach Initiatorkonzentration per GPC zu 3 kD bis 200 kD bestimmt. Fluoreszenztitrationen ergaben später vorwiegend 1:1-Stöchiometrien mit dem IL8 spezifischen Immunglobulin G. Nur wenige Comonomere trugen jedoch zu einer starken und selektiven IgG-Erkennung bei, dies waren vorwiegend die bereits aus der Kristallstrukturanalyse bekannten künstlichen Rezeptormoleküle für aromatische und aliphatische unpolare Aminosäuren, Histidin und basische Aminosäuren.



**Abb. 3.2.3:** Optimiertes Verfahren zur Minipolymerisation und Gefriertrocknung mit anschließendem ELISA-Screening zur Identifikation der besten Binder auf der Protein-A Bindungsstelle am IgG.

Insgesamt wurden im Zeitraum dieser Arbeit 53 Affinitätspolymere mit unterschiedlichsten Monomerzusammensetzungen und Molekulargewichten zwischen 3 und 1 200 kDa generiert (vgl. **Tabelle 3.2**), vollständig charakterisiert und

mittels ELISA-Technik und Fluoreszenztitration auf IgG-Affinität getestet. Aus diesem Pool wurden kleine Serien (Mini-Bibliotheken) von verwandten Copolymeren isoliert, die sich signifikant in Ladung und Hydrophilie unterscheiden. Sämtliche Vertreter wurden systematisch in vergleichenden Experimenten als Testplattform für die molekulare Erkennung von Immunglobulinen in Lösung untersucht.

Nachstehende Tabelle zeigt die im Rahmen dieser Arbeit neu entstandenen Polymere sowie ihre Zusammensetzung und Molekulargewichte.

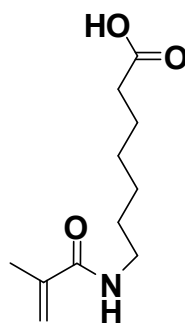
	BP	NTA	CBS	Benzamid in	CD	Cyclohex yl	Dodecyl	Ethylendi amin	Lysin	Phenylala nin	ApA	Aminohe xansäure	Methacryl säure	Glucosyl	Dansyl	M	AIBN
	eq	eq	eq	eq	eq	eq	eq	eq	eq	eq	eq	mol%	mol%	eq	eq	kDa	mol%
1			1											10	1	3	5
2			1											5	0.5	86	5
3			2		1									5	0.5	187	5
4			1			1								5	0.5	335	5
5			1			1	1							5	0.5	217	5
6			1				2							5	0.5	310	5
7		1						2						5	0.5	128	5
8				1	1									5	0.5	143	5
9				2		1								5	0.5	161	5
10		3		2										1	0.5	649	5
11				2				5						5	0.5	3	5
12			1	2			1	5						5	0.5	205	5
13				1										3	0.5	755	5
14			1	2	1									5			5
15					1			5						5		173	5
16			3				1							5	0.5		5
17		1	1											1	0.5	188	5
18	3				1		1		3					1	0.5	114	5
19	3				1				1					1	0.5	202	5
20	1	1							1					1	0.5	126	5
21	1	1								1				1	0.5	95	5
22						1					1			1	0.5		5
23								3			1			1	0.5		5
24									3		1			1	0.5		5
25	1										1			1	0.5		5
26	1				1						1			1	0.5		5
27							1				1			1	0.5		5
28					1			1	1		1			1	0.5		5
29					1				1		1			1	0.5		5
30										1	1			1	0.5		5
31	1				1	1	1				1			1	0.5	136	5
32	3				1					1				1	0.5	1 222	5
33	3													1	0.5	83	5
34	3	1												1	0.5	77	5
35	3	1			1									1	0.5	599	5
36	1				1									1	0.5	448	5
37	1				1									1	0.5	337	8
38	1				1									1	0.5	182	10
39	1				1									1	0.5	174	15
40	1				1									1	0.5	163	20
41	1													1	0.5	331	5
42	3													1	0.5	285	5
43	2										1			1	0.5	173	5
44	1										1			2	0.5	169	5
45	1										2			2	0.5	223	5
46	1				1						1			1	0.5	185	5
47	1				1								5	1	0.5	139	5
48	1				1								10	1	0.5	212	5
49	1				1								20	1	0.5	152	5
50	1				1							1		1	0.5	296	5
51	1				1							2		1	0.5	366	5
52	1				1							5		1	0.5	193	5
53	1				1							10		1	0.5	161	5

**Tabelle 3.2:** Übersicht der durch radikalische Polymerisation neu entstandenen linearen Affinitätspolymere.

Die synthetisierten Polymere lassen sich leicht in Gruppen einteilen. Zum einen sind das Polymere mit hohem Anteil an CBS-, Lysin- bzw. Benzamidin-Monomer (Polymere **1** bis **17**), welche vorzugsweise Carboxylate auf der Proteinoberfläche

ansteuern sollen und somit einen Ersatz für das YTR-Monomer darstellen. Zum anderen wurden Polymere zur Erkennung von Arginin- bzw. Lysin-Resten entwickelt (Polymere **31** bis **53**), welche eine Komplexierung durch einen hohen Anteil an negativ geladenen Monomeren sicherstellen. Da die Polymere in wässrigen Puffern arbeiten sollen, muss eine besonders gute Wasserlöslichkeit gewährleistet werden, welche durch Copolymerisation des Glucosyl-Monomers sichergestellt wird. Außerdem wurde in fast jedem Affinitätspolymer ein geringer Anteil an Dansyl-Monomer copolymerisiert, um in nachfolgenden Bindungsstudien über die Dansylfluoreszenz Bindungskonstanten für einen Polymer/IgG-Komplex zu bestimmen. Die Oberflächenanalyse des Anti-IL8 ergab, dass dieser basische Antikörper nicht nur eine große Anzahl an Lysinen und Argininen auf der Oberfläche und besonders in der Nähe der Protein A-Bindungsstelle trägt, sondern auch eine Reihe von Histidinen und aromatischen Aminosäuren. Daher fiel die Wahl der Monomere auf das Bisphosphonat-, das NTA- und das Cyclodextrin-Monomer. Eine Kombination dieser Monomere sollte demnach ein Copolymer mit hoher Affinität für das Anti-IL8 ergeben. Als Epitop spezifisches Monomer wurde das ApA-Monomer, als Mimetikum für das Phenylalanin-Tyrosin Dipeptid, copolymerisiert (Polymere **43** bis **46**), welches durch seine Aromaten hervorragend für dieses hydrophobe Epitop prädestiniert ist.

Des Weiteren wurde ein Carbonsäure-Monomer copolymerisiert, durch welches es möglich war Affinitätspolymere an einer festen Phase zu immobilisieren (Polymere **47** bis **53**). Hierbei handelt es sich einfach um Methacrylsäure oder um das von *Gilles* synthetisierte Aminohexansäure-Monomer **28** (vgl. **Abbildung 3.2.4**).



Aminohexansäure-Monomer

28

**Abb. 3.2.4:** Struktur des Aminohexansäure-Monomers **25** zur Immobilisierung an einer festen Phase.

Der Vorteil gegenüber Methacrylsäure ist die größere Flexibilität dieser Rezeptoreinheit. Aufgrund des C-6 Spacers wird zum einen eine intramolekulare Abstoßung vermieden und zum anderen wird die Immobilisierung auf einem festen Medium begünstigt bzw. erfährt das immobilisierte Polymer hierdurch eine größere Bewegungsfreiheit. Dies ist besonders wichtig für den „Capture“-Schritt, in dem das Polymer sich frei bewegen sollte, um mit größtmöglicher Effektivität an das IgG-Molekül zu binden. Als Nachteil des Aminohexansäure-Monomers ist eine geringe Wasserlöslichkeit gegenüber dem einfachen Methacrylsäure-Monomer zu erwähnen, die allerdings durch geeignete Polymerisationspartner aufgehoben werden kann.

Die Kettenlänge der linearen Polymere kann theoretisch durch unterschiedliche Initiaterkonzentrationen variiert werden. Jedoch zeigten Vorarbeiten, dass sich die Molekulargewichte zwischen 0.5 mol% und 3 mol% Radikalstarter kaum unterscheiden.<sup>[65]</sup> AIBN-Konzentrationen zwischen 5 mol% und 10 mol% zeigten allerdings eine starke Konzentrationsabhängigkeit (vgl. Polymere **36** bis **40**). Hier konnte z.B. durch Verdopplung der AIBN-Konzentration eine deutliche Reduzierung der Molekulargewichte erreicht werden.



### 3.3 Polymer Screening

Zur Affinitätsbestimmung der Polymere an die Protein-A-Bindungsstelle wurde ein ELISA etabliert, welcher das Prinzip der Konkurrenz zwischen den Affinitätspolymeren und Protein A um dieselbe Bindungsstelle am IgG ausnutzt.

Der ELISA ist eine spezielle enzym-immunologische Methode um sehr elegant, effektiv und zuverlässig sowohl Antigene als auch Antikörper in biologischen Flüssigkeiten zu messen. ELISAs werden häufig verwendet um Hormone, Tumormarker, Proteine oder Peptide nachzuweisen. In der Infektionsserologie setzt man die ELISA-Technik ein um entweder Antigene oder Antikörper im menschlichen Serum, ohne vorherige Extraktion, zu bestimmen.

Hierbei nutzt man die Antikörper-Antigen-Reaktion, wobei entweder der Antikörper oder das Antigen mit einem Enzym gekoppelt ist. Der Nachweis der Antikörper-Antigen-Bindung erfolgt durch Zugabe eines Substrates, welches durch das gekoppelte Enzym umgesetzt wird. Zu Nutze macht man sich die Wechselwirkung zwischen Avidin und seinem Liganden Biotin, welche die stärkste bekannte nichtkovalente Bindung darstellt. Die Dissoziationskonstante dieses Komplexes liegt in der Größenordnung von  $10^{-15}$  M. Damit übertrifft dieser Komplex sogar die Wechselwirkungen zwischen einem Antikörper und seinem Antigen, welche in der Größenordnung von  $10^{-9}$  M liegen.

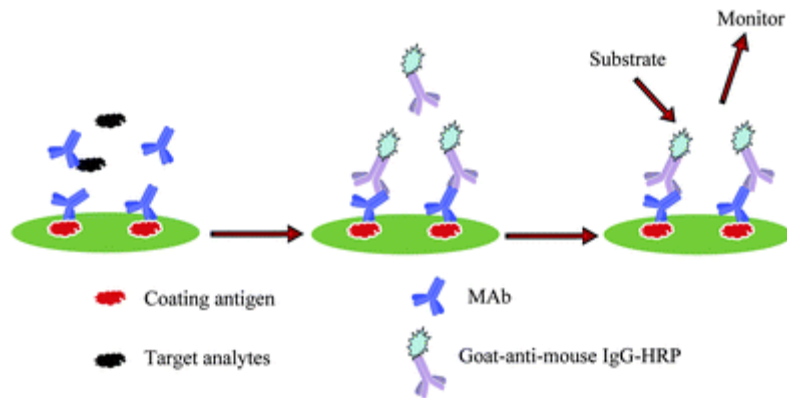
Die Signalstärke dieser Enzym-katalysierten Farbreaktion, erkennbar am Farbumschlag, korreliert dabei direkt bzw. indirekt, je nachdem ob man einen klassischen oder einen kompetitiven ELISA verwendet, mit der Konzentration des nachzuweisenden Stoffes. Alternativ zur Farbreaktion werden zum Nachweis auch Fluoreszenz- oder Chemolumineszenzverfahren verwendet.

Der wesentliche Vorteil von Immunosorbent assays liegt in der schnellen und leichten Anwendung, mit denen man große Probenmengen in kürzester Zeit untersuchen und auswerten kann. Es ist nur ein geringes Probenvolumen nötig, sowie wenige und kaum störanfällige Geräte notwendig. Zudem sind diese Testverfahren leicht automatisierbar und ermöglichen eine ökonomische Bestimmung verschiedener Parameter, welche im Bereich der medizinischen Diagnostik, in der klinischen Chemie und der Immunologie kommerzielle Bedeutung erlangt haben.

Im Wesentlichen können drei ELISA-Formate unterschieden werden: indirekt (Antikörper-Capture), kompetitiv (blocking) und direkt (Antigen-Capture).

### **Indirekter ELISA<sup>[66]</sup>**

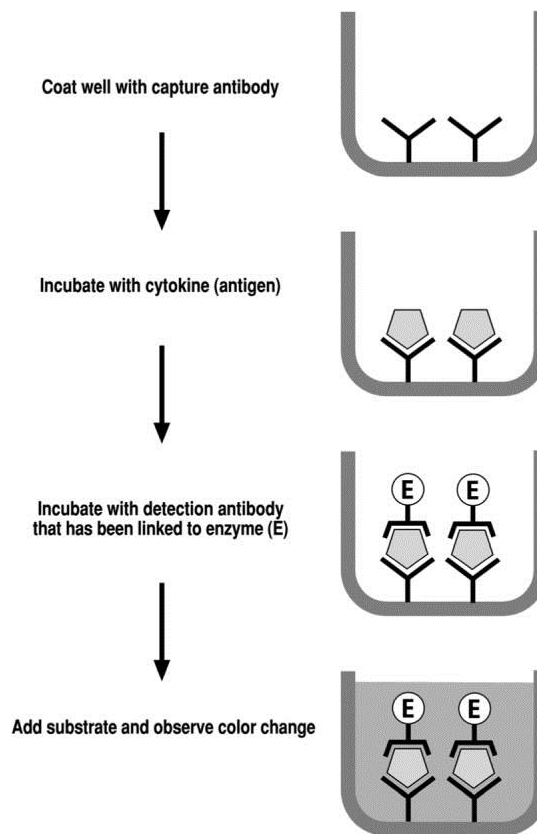
Beim indirekten ELISA wird der in der Probe enthaltene Antikörper zwischen einem an die Platte gebundenen Antigen und einem enzymmarkierten, anti-Speziesglobulinkonjugat gebunden. Dafür wird die Mikrotiterplatte zunächst mit dem Antigen beschichtet, an das die Antikörper binden können. Sofern antigenspezifische Antikörper in der Probe vorhanden sind, binden diese an die Antigene, welche an der Gefäßwand haften. Unspezifische Antikörper binden nicht und können durch anschließendes Waschen entfernt werden. Antikörper, die an das Antigen gebunden haben, lassen sich mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper, auch als Konjugat bezeichnet, detektieren. Als Konjugat verwendet man z.B. Anti-Immunglobulin G-Antikörper, an die das Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase) kovalent gebunden ist. Diese Detektionsantikörper reagieren mit den Antikörpern aus der Probe. Es bildet sich ein Komplex aus immobilisiertem Antigen, Antikörper und markiertem Detektionsantikörper. Nach wiederholtem Waschen werden alle nicht gebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wird eine Lösung hinzugegeben, welche das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzin für das Enzym enthält. Ein Farbumschlag zeigt an, dass in der Probe der gesuchte Antikörper vorhanden ist, welcher an das Antigen auf der Platte gebunden hat. Diese Färbung ist proportional zur Menge der aus der Probe gebundenen Antikörper. Je mehr Antikörper die Probe enthält, desto intensiver ist die Farbentwicklung in den Testvertiefungen. Die Intensität der Färbung kann photometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Mit Hilfe einer Standardreihe lässt sich die Konzentration der Antikörper in der Probe auch quantitativ bestimmen. Diese Art des ELISA ist geeignet für die Bestimmung von Antikörpertitern in Proben.



**Abb. 3.3.1:** Schematische Darstellung der Methode eines indirekten ELISA.<sup>[67]</sup>

### Direkter (Antigen-Capture) ELISA<sup>[66]</sup>

Beim direkten, nichtkompetitiven ELISA wird das Antigen in der Probe zwischen den an die Platte gebundenen Antikörpern und einem enzymmarkierten Konjugat eingefangen („Sandwich“ ELISA). Das Antikörperkonjugat kann mono- oder auch polyklonal sein. Hier wird zuerst ein Antikörper an die Platte gekoppelt, der gegen das gesuchte Antigen/Protein in der Probe gerichtet ist. Das nachzuweisende Antigen/Protein bindet an diesen Antikörper und kann im nächsten Schritt mit einem Enzym-markiertem Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Auch hier dient HRP für die Markierung des Antikörpers. Es bildet sich ein Komplex aus immobilisiertem Antikörper, Antigen/Protein und dem Konjugatantikörper. Durch Zugabe eines Substrats entwickelt sich eine Färbung. Diese Färbung ist direkt proportional zu der Menge an Zielantigen in der Probe.



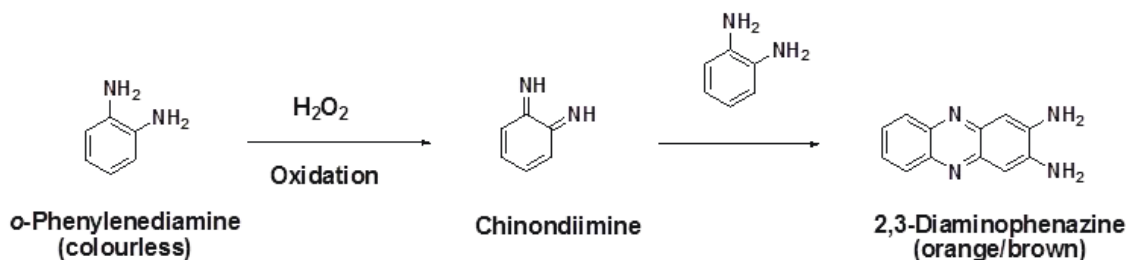
**Abb. 3.3.2:** Schematische Illustration des „Sandwich“ ELISA.<sup>[68]</sup>

### **Kompetitiver (blocking) ELISA<sup>[66]</sup>**

Bei dieser Art des ELISA konkurrieren die spezifischen Antikörper in der Probe mit dem enzymmarkierten, spezifischen Antikörper im Konjugat bzw. blockieren diesen. Durch Hinzufügen eines Enzymsubstrat-Chromogenreagenz entwickelt sich eine Färbung. Diese Färbung ist umgekehrt proportional zu der Menge der gebundenen Antikörper in der Probe. Je mehr Antikörper in der Probe vorhanden sind, desto weniger intensiv ist die Farbentwicklung in den Testvertiefungen.

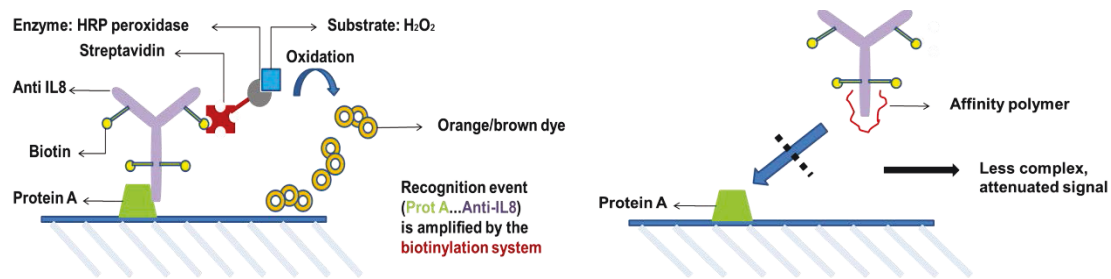
### Kompetitiver IgG/Protein A ELISA

In dieser Arbeit wurde das Prinzip eines kompetitiven ELISAs aufgegriffen und hinsichtlich der Bedürfnisse der Affinitätsbestimmung zwischen Polymer und IgG modifiziert. Anstelle des Antigens wurde die Mikrotiterplatte mit Protein A beschichtet. Nach anschließender Blockierung freier Bindungsstellen mittels BSA wurde eine Lösung, bestehend aus Polymer und mit Biotin markiertes Anti-IL8, auf die mit Protein A beladene Mikrotiterplatte gegeben. Nun konkurrieren das immobilisierte Protein A und das in Lösung vorhandene Polymer um die Protein A-Bindungsstelle auf dem Antikörper. Je stärker die Bindung zwischen Polymer und Anti-IL8 ist, desto weniger Antikörper wird auf der Mikrotiterplatte gebunden und desto weniger intensiv findet die folgende Farbreaktion statt. Diese besteht aus der Umwandlung von farblosem *o*-Phenyldiamin in orange/braunes 2,3-Diaminophenazin (vgl. **Abbildung 3.3.3**)



**Abb. 3.3.3:** Enzymkatalysierte Farbreaktion als Parameter der IgG-Konzentration eines kompetitiven ELISAs.

Mit Hilfe dieses ELISA-Experiments wurden die oben genannten kleinen Bibliotheken von Copolymeren auf ihre IgG-Affinität hin untersucht. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven ELISA, welcher es ermöglicht, indirekt Bindungskonstanten zwischen Polymer und IL-8-Antikörper in physiologischer Lösung zu bestimmen. Ein enzymgetriebenes Reportersystem zeigt die hochaffine Bindung des beladenen Antikörpers an immobilisiertem Protein A durch eine Farbreaktion an. Somit ist die Absorptionsintensitäts-Abnahme des Produktmoleküls in Anwesenheit des Inhibitors ein Maß für die Verdrängung des beladenen Antikörpers von Protein A.

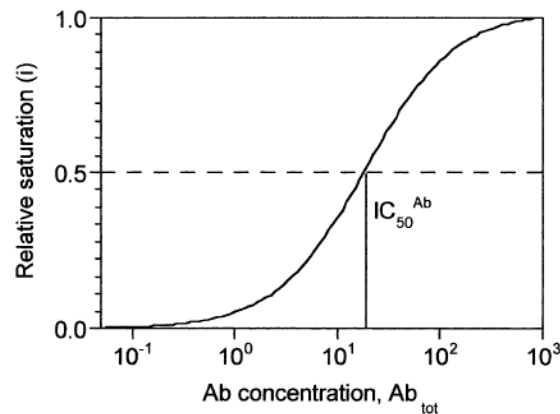


**Abb. 3.3.4:** Kompetitiver ELISA zur Verdrängung von Protein A aus seiner IL-8-Bindungsstelle durch Affinitätspolymere.

Das Ergebnis dieses Screenings zeigte in der ersten Runde lediglich 3 Hits. Diese Affinitätspolymere hatten die folgende statistischen Zusammensetzung: Polymer **35** (3BP, 1CD, 1NTA, 1Glucose, 0.5 Dansyl), Polymer **33** (3BP, 1CD, 1Glucose, 0.5 Dansyl) und Polymer **34** (3BP, 1NTA, 1Glucose, 0.5 Dansyl). Sie konnten als einzige das optische ELISA-Signal deutlich schwächen (bis zu 30%) und dadurch ihre Bindung an den Antikörper demonstrieren (Fehler < 5%). Bei den übrigen Polymeren konnte keine signifikante Erniedrigung der optischen Dichte festgestellt werden bzw. diese Polymere konnten wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit nicht im ELISA untersucht werden.

### Bestimmung der Bindungskonstanten

Für die Quantifizierung des ELISAs wurden Methoden nach *Cheng und Prusoff* <sup>[69]</sup> und *Rodbard und Leward* <sup>[70]</sup> verwendet. Eine Reinprobe des Antikörpers wurde mit genauer Konzentrationsangabe gegen Protein A auf der Platte titriert. Die Konzentration wurde anschließend gegen die ermittelte optische Dichte (OD) bzw. die Sättigung  $i$  dieser Verdünnungsreihe aufgetragen und somit eine Sättigungskurve erhalten.



Diese Sättigungskurve wurde anschließend durch logit/log Transformation linearisiert, sodass jedem OD-Wert eine Antikörperkonzentration zugewiesen werden kann.

Nachfolgende Betrachtungen beruhen darauf, dass eventuelle Grenzflächeneffekte an der Phasengrenze fest-flüssig vernachlässigt werden ebenso dass alle Reaktionen einer Kinetik 1. Ordnung folgen. Es wird darüberhinaus angenommen, dass der verwendete Antikörper ein monovalentes Bindungsverhalten zeigt. Aus dem Massenwirkungsgesetz der Komplexbildungsreaktion kann nun der Scatchard-Plot hergeleitet werden:

$$K = \frac{[YA]}{[Y][A]} \text{ und } [YA] = x$$

$$K = \frac{x}{([A]_0 - x)([Y]_0 - x)} \Leftrightarrow \frac{x}{[A]_0 - x} = K[Y]_0 - Kx$$

bzw.

$$\frac{\text{Analyt}^{\text{gebunden}}}{\text{Analyt}^{\text{frei}}} = -K \text{Analyt}^{\text{gebunden}} + K[Y]_0$$

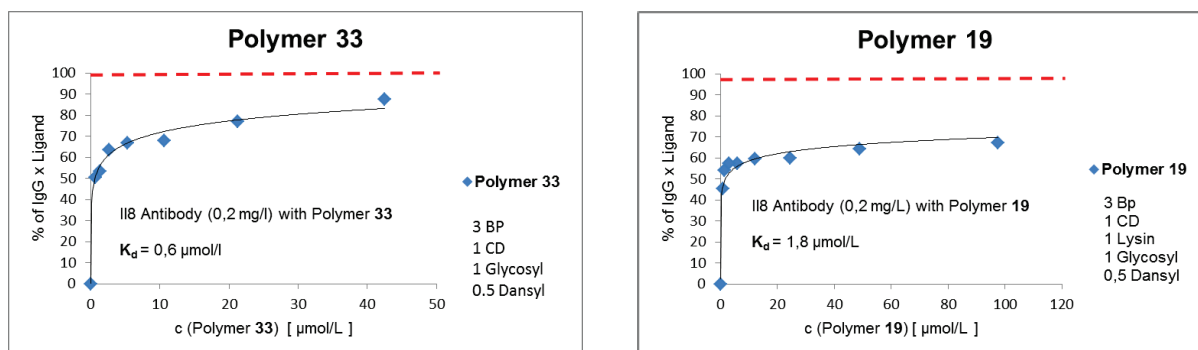
X ist die Reaktionslaufzahl,  $A_0$  und  $Y_0$  sind die Anfangskonzentrationen von Analyt und Antikörper.

Bei der Auftragung des Quoteinten  $\text{Analyt}^{\text{gebunden}} / \text{Analyt}^{\text{frei}}$  gegen  $\text{Analyt}^{\text{gebunden}}$  erhält man theoretisch eine Gerade der Steigung  $-K$  mit dem Abszissenabschnitt  $K[Y]_0$ . Anhand dieser Geraden kann unter Verwendung der jeweiligen Konzentration des Analyt/Antikörper Komplexes die Assoziationskonstante dieses Komplexes ermittelt werden. Im Folgenden wurde zur Visualisierung der Affinität die Konzentration des Liganden (Polymer) gegen den prozentualen Anteil des

Antikörper/Ligand Komplex aufgetragen. Dieser prozentuale Anteil des Komplexes wurde gemessen an der Gesamtkonzentration an Antikörper, die der Reaktion zur Verfügung stand. Je steiler die Sättigungskurve verläuft, desto größer ist die Affinität des Liganden zu dem Antikörper.

Aus dem ELISA-readout wurden unter physiologischen Bedingungen für die beiden besten Copolymere Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich ermittelt: Polymer **33** ( $K_d = 0.60 \mu\text{mol/L}$ ) und Polymer **34** ( $K_d = 18.0 \mu\text{mol/L}$ ). Damit unterscheidet sich das beste Polymer aus der ersten Runde von Protein A nur durch den Faktor 4 (Literaturwert für die Protein A-IgG-Affinität:  $K_d = 0.15 \text{ mol/L}$ ).<sup>[62]</sup>

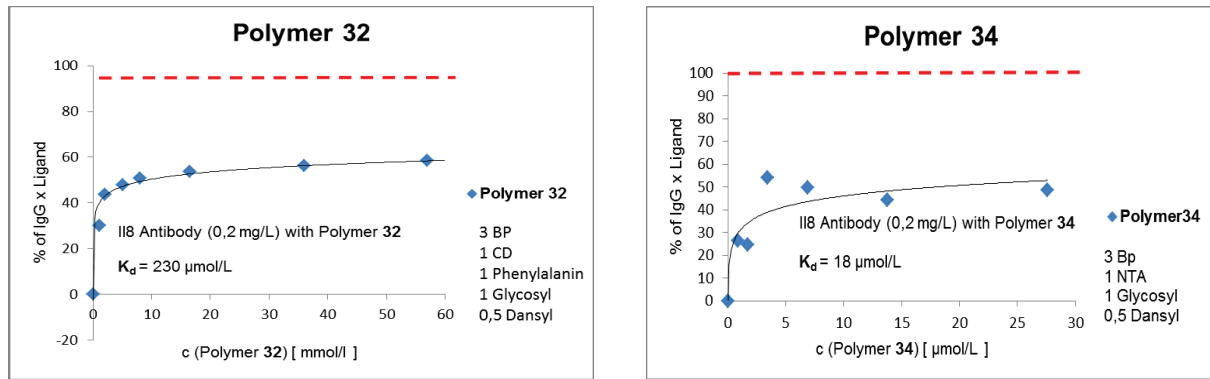
Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Polymere **19** und **32** zeigt deutlich die Notwendigkeit des Bisphosphonats und des Cyclodextrins im Polymer an, um Protein A von der Proteinoberfläche des IgG-Moleküls zu verdrängen. Copolymerisiert man zu der bestehenden Monomerzusammensetzung des Polymer **33** zusätzlich ein Äquivalent Lysin, so nimmt auch hier die Dissoziationskonstante auf  $1.8 \mu\text{M}$  zu. Diese Zunahme kann man ebenfalls mit einer intramolekularen Wechselwirkung erklären, hier zwischen dem Bisphosphonat und Lysin.



**Abb. 3.3.5:** Vergleich der Dissoziationskonstanten aus ELISA-Messungen zwischen dem Best Binder Polymer **33** und Polymer **19**.

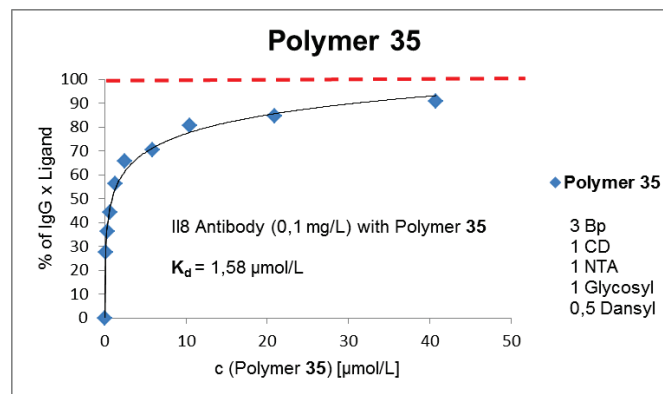
Im Fall des Polymers **32** wurde zu der bestehenden Monomerzusammensetzung von Polymer **33** ein Äquivalent Phenylalanin copolymerisiert. Dies hat zur Folge, dass die Dissoziationskonstante auf  $2.3 \text{ mM}$  zunimmt, da das Polymer den IgG-bindenden Einfluss des Cyclodextrins durch intramolekulare Wechselwirkung mit dem Phenylalanin verliert.





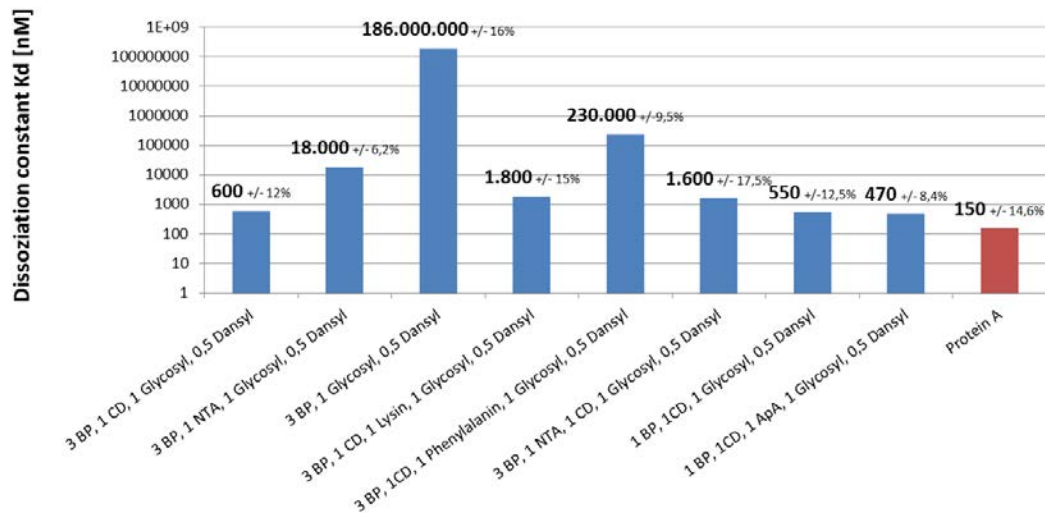
**Abb. 3.3.6:** Vergleich der Dissoziationskonstanten aus ELISA-Messungen zwischen dem Best Binder Polymer **32** und Polymer **34**.

Die Messung mit Polymer **35**, einer Mischung aus Polymer **33** und **34**, ergab eine Dissoziationskonstante von  $1.6 \mu\text{mol/L}$  und zeigt dadurch ebenfalls den Wert des Cyclodextrin-Anteils im Copolymer an.



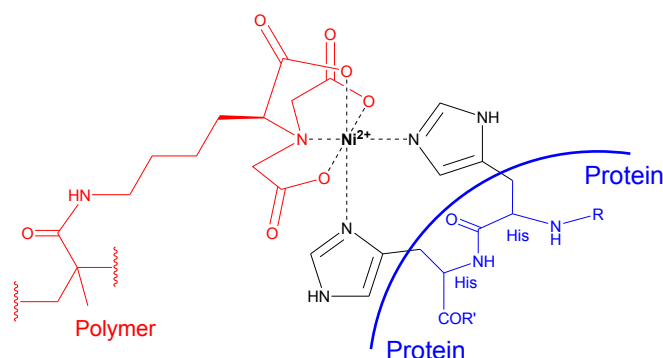
**Abb. 3.3.7:** Bindungskurve zur Bestimmung der Dissoziationskonstante aus ELISA-Messung für Polymer **35**.

Ein Vergleich der aus dem ELISA ermittelten Dissoziationskonstanten einiger Polymere unterschiedlicher Zusammensetzung zeigt die Überlegenheit einer Kombination aus Bisphosphonat- oder NTA- und Cyclodextrin-Baustein im Polymer an (reines Bisphosphonat bindet eine Millionen mal schwächer!). Zusätzliche ApA-Monomere führen zu einer weiteren leichten Affinitätssteigerung (**Abbildung 3.3.8**).



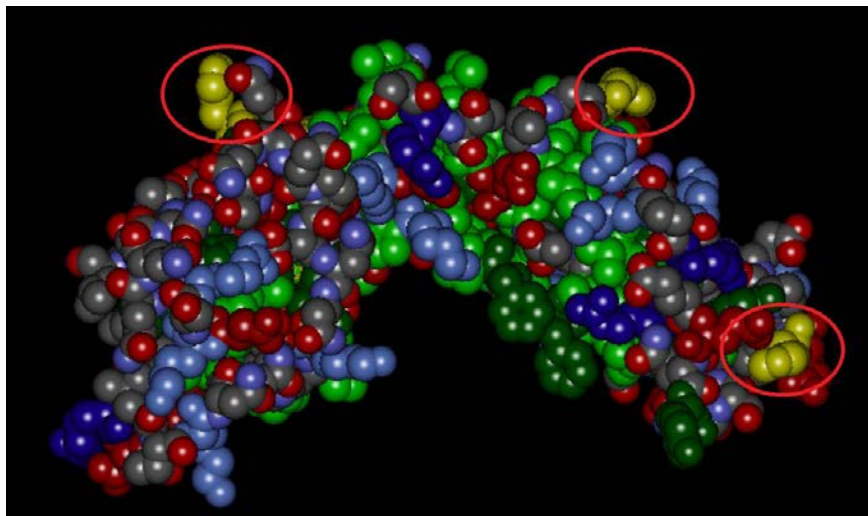
**Abb. 3.3.8:** Übersicht der Dissoziationskonstanten aus ELISA-Messungen einiger Polymere.

Sämtliche Messungen mit Polymeren, welche den NTA-Baustein enthalten, wurden ohne das komplexbildende Nickel als Zentralion durchgeführt, da sich die Bindungskonstanten bei Anwesenheit des Nickel-Kations nicht signifikant von denen ohne Nickel unterschieden. Dies spricht für eine Bindung der Polymere an das Protein IgG, die im Wesentlichen auf elektrostatischen/ionischen Wechselwirkungen beruht und weniger auf dem Einfluss der Histidin-Komplexierung durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen komplexierende Nitrilotriacetat-Derivate, bei dem das  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion oktaedrisch von den drei Carboxylaten und dem tertiären Amin des NTA-Moleküls sowie von zwei Stickstoff-Atomen des Imidazol-Ringes zweier Histidin-Reste des Proteins komplexiert wird (vgl. **Abbildung 3.3.9**).



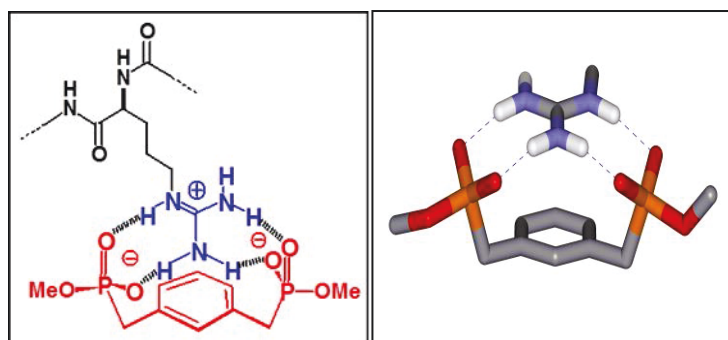
**Abb. 3.3.9:** Zwei Histidin-Reste eines Proteins werden über ein  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion von der NTA-Einheit komplexiert.

Die Histidin-Reste müssen sich auf der Oberfläche in räumlicher Nähe befinden, jedoch nicht notwendig in direkter Nachbarschaft in der Proteinsequenz vorliegen. Dieses Bindungsmotiv wurde bereits erfolgreich von *Shea* als Monomer weiterentwickelt und mit einem polymerisierbaren Rest funktionalisiert.<sup>[71]</sup> Ein Blick auf die Kristallstruktur des IgG zeigt, dass sich zwar wenige Histidine auf der Proteinoberfläche befinden, diese jedoch viel zu weit entfernt voneinander lokalisiert sind, so dass eine derartige Komplexierung über das  $\text{Ni}^{2+}$ -Kation mittels NTA-Molekül nicht eintreten kann.



**Abb. 3.3.10:** Kristallstruktur des Fc-Fragments von IgG. Verteilung der Histidin-Reste (gelb) auf der Protein-Oberfläche von IgG.

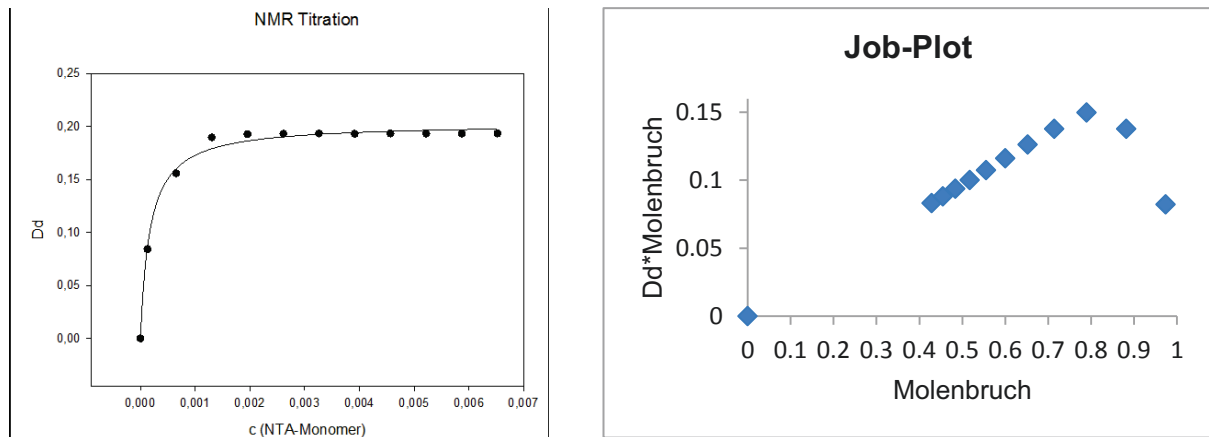
Vielmehr ist es wahrscheinlicher, dass sich die Acetat-Gruppen des NTA-Monomers an Arginin- oder Lysin-Reste binden und somit wie der Bisphosphonat-Baustein einen Rezeptor für basische Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche darstellt. Die von *Schrader* entwickelte Bisphosphonat-Baustein wird als Monomer in Copolymeren zur Komplexierung von Guanidinium-Ionen eingesetzt.<sup>[72]</sup> Durch Wasserstoffbrücken,  $\pi$ -Kation- und elektrostatische Wechselwirkungen können Arginin-Reste auf Proteinoberflächen von bisphosphonathaltigen Polymeren erkannt und gebunden werden.<sup>[73]</sup>



**Abb. 3.3.11:** Erkennungsmotiv der Bisphosphonatpinzette. Links: Komplex aus Bisphosphonat-Pinzette und einem Arginin-Rest. Rechts: Komplex aus Bisphosphonat-Pinzette und 1-Methylguanidin.<sup>[74]</sup>

Die Bindungskonstante eines Komplexes, bestehend aus Arginin und der Bisphosphonat-Pinzette, liegt in DMSO bei ca.  $8.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  und demonstriert somit die Stärke dieser Wechselwirkung.<sup>[72]</sup>

Um nun herauszufinden, ob der NTA-Baustein ähnliches Potential zur Komplexierung basischer Aminosäuren besitzt, wurden jeweils NMR-Titrations mit Arginin bzw. Lysin und dem NTA-Baustein in Form des Monomers durchgeführt. Die NMR-Titration mit Arginin ergab lediglich eine verschwindend geringe Affinität, die gleiche Titration mit Lysin allerdings erbrachte erstaunliche Ergebnisse. Es konnte eine Bindungskonstante von  $2.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  in DMSO für den entstandenen Komplex ermittelt werden. Aufgrund des Job-Plots kann von einer 3:1 Komplexstöchiometrie ausgegangen werden, bei dem drei Moleküle Lysin von einem Molekül NTA-Monomer gebunden werden.



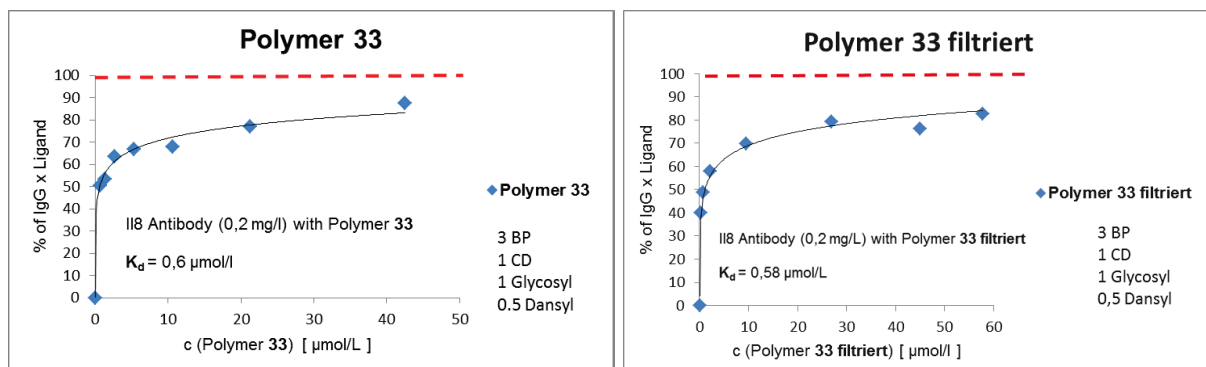
**Abb. 3.3.12:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve des NTA-Monomer/Lysin Komplexes; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es nicht mehr verwunderlich, dass das Polymer **34** mit einer  $K_d$  von 18.0  $\mu\text{mol/L}$  für den Polymer/IgG-Komplex zur Gruppe der „Best Binder“ gehört. Trotz Fehlen der CD- und ApA-Bausteine bindet Polymer **34**, mit einer Comonomermischung bestehend aus 3 eq. BP, 1 eq. NTA, 1 eq. Glucosyl, 0.5 eq. Dansyl, an die Protein A-Bindungsstelle des IgG mit rund 10.000 fach größerer Affinität als ein reines BP-Polymer. Das NTA-Molekül ist also in der Lage ohne das  $\text{Ni}^{2+}$ -Kation einen stabilen Komplex mit Lysin einzugehen und konnte somit erfolgreich als geeigneter Rezeptor für Lysin-Reste auf Proteinoberflächen eingesetzt werden.

### Monomerrückstände

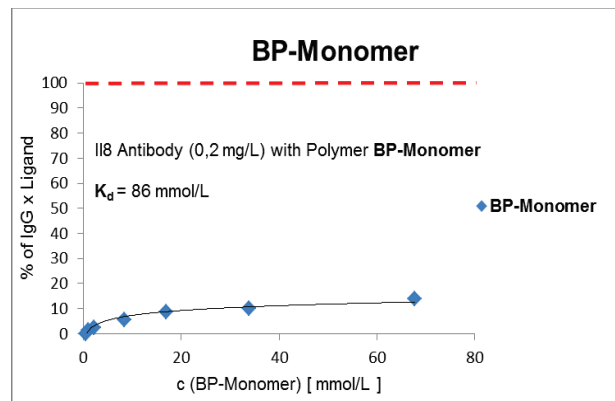
Eine Befürchtung bestand hinsichtlich der unklaren Auswirkung von nicht umgesetzten Monomeren in den Polymermischungen. Diese wurden in vorherigen Arbeiten nach der Polymerisation nicht von den Polymeren abgetrennt und somit mit den Polymeren in Assays und Messungen von Bindungskonstanten eingesetzt, ohne dass man deren Einfluss auf die zu untersuchende Größe kannte. Diese Monomerrückstände könnten unter Umständen mit Lysinen oder Argininen auf der Proteinoberfläche reagieren, wodurch das Ergebnis in z.B. Bindungsstudien beeinflusst werden kann oder in Enzymassays zur Denaturierung des Enzyms führen kann. Um wirklich ausschließen zu können, dass Monomerrückstände derartige

Störungen verursachen, wurden sämtliche Polymere in dieser Arbeit über eine 3 kDa cut-off Säule gereinigt (siehe Kap. 3.2) bevor sie in Assays eingesetzt wurden. Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten zwischen dem mit Monomeren verunreinigtem Polymer **33** und dem gereinigten Polymer **33** zeigt **Abbildung 3.3.13**. Die Dissoziationskonstanten unterscheiden sich kaum. Das rohe Polymer **33** bindet nur leicht schwächer an das IgG ( $K_d = 0.60 \mu\text{mol/L}$ ) als das gereinigte Polymer **33** ( $K_d = 0.58 \mu\text{mol/L}$ ). Die minimale Differenz ist durch eine geringere Konzentration an eingewogenem Polymer zu erklären, da das verunreinigte Polymer **33** aus ca. 10% Monomeren und 90% Polymer besteht, das gereinigte Polymer **33** zu 100% aus Polymer besteht. Dies ist ein erster Hinweis auf die Inaktivität der Monomere.



**Abb. 3.3.13:** Vergleich der Dissoziationskonstanten, gemessen mit dem Protein A-ELISA, zwischen gereinigtem Polymer (rechts) und ungereinigtem Polymer (links).

Um wirklich sicher zu gehen, dass die Monomerrückstände keinen Einfluss auf die Messungen haben, wurde stellvertretend für diese Monomerrückstände das BP-Monomer im ELISA eingesetzt und auf Affinität zum Anti-IL8 hin getestet. Das Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass nicht umgesetzte Monomere nur einen minimalen bis keinen Einfluss auf die Bindungsmessungen haben. Die Dissoziationskonstante des BP-Monomers ist mit  $86 \text{ mmol/L}$  vernachlässigbar groß. Somit trägt sie zur Bindung des Polymers zum IgG nicht wesentlich bei.



**Abb. 3.3.14:** Bindungskurve zur Bestimmung der Dissoziationskonstante aus ELISA-Messung für das BP-Monomer.

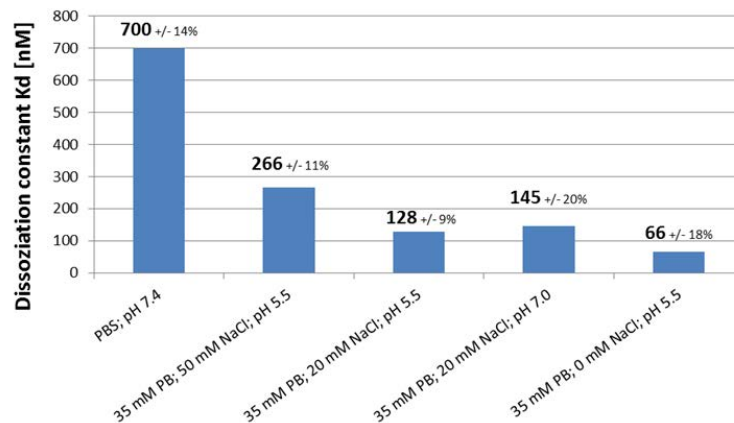
Es kann abschließend festgehalten werden, dass Monomerrückstände, welche nicht vom Polymer abgetrennt werden, weder einen signifikanten Einfluss auf die Polymeraktivität haben noch in irgendeiner Weise mit dem zu untersuchendem Protein interagieren. Sie sollten dennoch, für eine genauere Einwaage bzw. Konzentrationsbestimmung der Polymere in Assays, abgetrennt werden.

### Fluoreszenztitrationen

Zur Bestätigung der indirekt im ELISA ermittelten IgG-Affinitäten, wurden mit zahlreichen Polymeren direkte Fluoreszenztitrationen durchgeführt. Diese konnten die aus dem ELISA erhaltenen Werte sehr gut bestätigen. Mit dem besten Polymer **P40.5** (statistische Monomer-Zusammensetzung: 1 BP; 1 CD; 1 Glucosyl; 0.5 Dansyl) wurden in wässrigem Phosphatpuffer (35 mM) weitere Vergleichsmessungen bei unterschiedlichem Salzgehalt bzw. pH-Wert durchgeführt.

Bei sinkendem Salzgehalt steigt die IgG-Affinität des Polymers deutlich und zeigt dadurch eine starke Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen an. Eine Erniedrigung des pH-Werts von 7.0 auf 5.5 hat dagegen kaum einen Einfluss auf die Bindungsenergie. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu neuen Arbeiten von *Shea et al.* zur Antikörper-Erkennung durch Hydrogel-Nanopartikel. Dort führte erst die pH-Wert-Erniedrigung zu einer messbaren IgG-Bindung an die Nanopartikel. Es wurde mit der Protonierung der Histidine argumentiert, welche bei pH 5.5 über

Carboxylate im Polymer gebunden werden sollen.<sup>[82]</sup> Offensichtlich trägt solch ein Effekt auch in diesem Fall zur Bindung bei. Allerdings ist dieser Effekt nicht wie bei *Shea* dominierend für die Bindung zum IgG, da diese auch bei neutralem pH-Wert schon ausgeprägt ist (vgl. **Abbildung 3.3.15**).



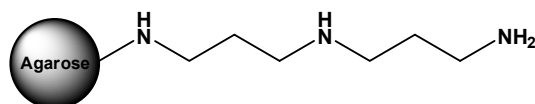
**Abb. 3.3.15:** Übersicht der Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung zwischen IgG und einem Affinitätspolymer aus Fluoreszenztitrationen: Polymer P40.5 (1 BP; 1CD; 1 Glucosyl; 0.5 Dansyl).

Die Fluoreszenztitration ohne NaCl erwies sich als etwas schwierig, da der Antikörper, um gelöst zu bleiben, ein Minimum von 20 mM NaCl benötigt. Daher kommt es bei der Umpufferung des Antikörpers zur Löslichkeitsverminderung bis hin zum Ausfallen des Antikörpers aus der Lösung. Die Konzentration des in Lösung verbliebenen Antikörpers wurde anschließend durch Tryptophan-Fluoreszenz korrigiert und diese zur Bestimmung der Bindungskonstanten verwendet.



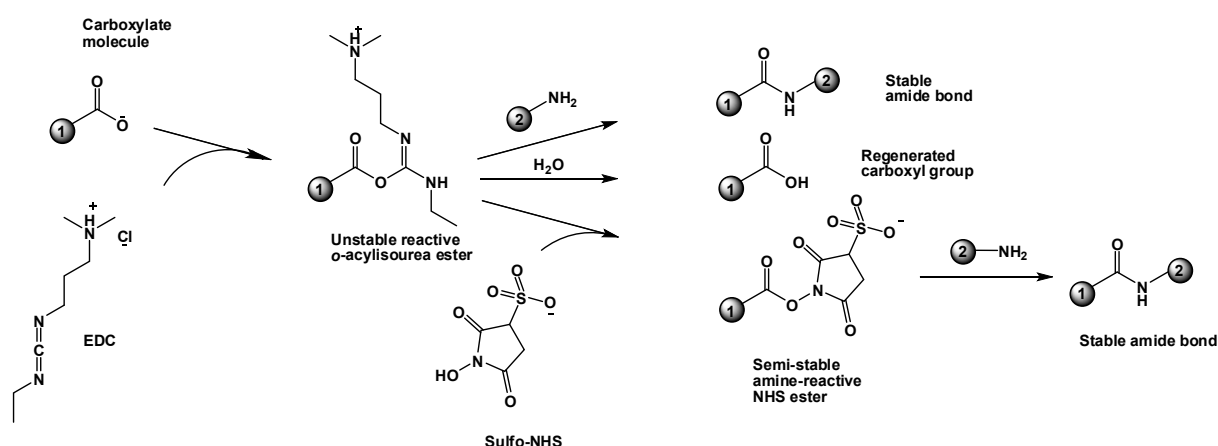
### 3.4 Polymer-Immobilisierung

Zur Polymer-Immobilisierung wurde die gleiche Monormischung des besten Polymers mit 5% eines Monomers aus Aminohexansäure und Methacrylsäure (Hydroxycarbonylheptylmethacrylamid) copolymerisiert. Das neue Copolymer mit freien Carbonsäuregruppen wurde anschließend peptidisch an eine Aminophase gekuppelt. Dabei handelt es sich um ein quervernetztes Agarose-Harz, welches mit Diaminodipropylamin (DADPA) funktionalisiert wurde (CarboxyLink™ Coupling Gel). Die folgenden Reaktionen und Capture- sowie Elutionsschritte wurden in 500  $\mu\text{L}$  gravity-flow Säulen von Pierce durchgeführt.



**Abb. 3.4.1:** Struktur des CarboxyLink™ Coupling Gels.

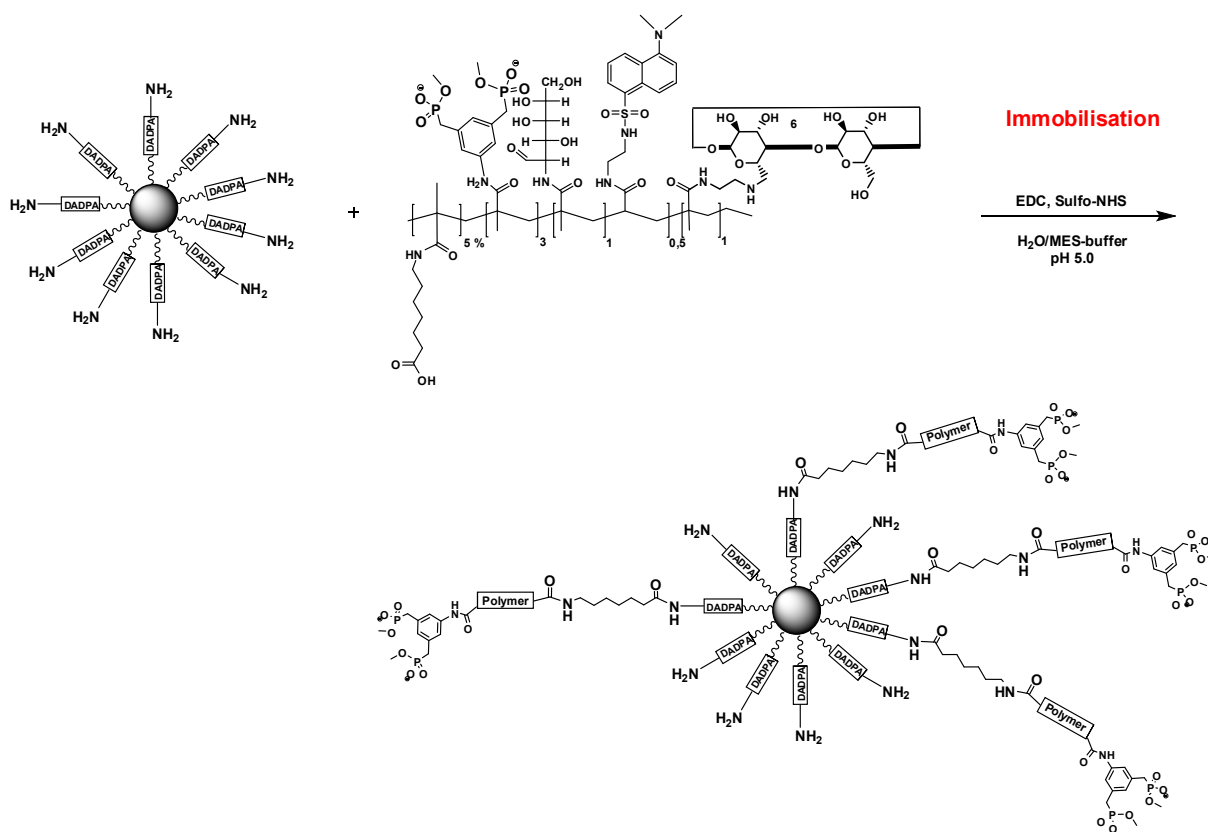
Für beste Ergebnisse wurde das Coupling Gel zunächst in MES-Puffer (pH-Wert 5.0) äquilibriert, anschließend die zu kuppelnde Carbonsäure mit EDC und Sulfo-NHS aktiviert und schließlich in PBS-Puffer (0.1 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.5) an die Aminophase gekuppelt.<sup>[75]</sup>



**Abb. 3.4.2:** Reaktionsschema der EDC-Kupplung durch Aktivierung mittels Sulfo-NHS.<sup>[75], [76], [77]</sup>

Das Kupplungsreagenz EDC ist ein carboxyl- und amin-reaktiver Cross-Linker, welcher zuerst mit der Carboxylfunktion reagiert und ein reaktives Intermediat bildet. Dieses reagiert schnell mit der Amino-Gruppe zu einer stabilen Amidbindung. Da das Intermediat sehr instabil in wässrigen Lösungen ist und wieder zur Carbonsäure reagieren kann, wird der Kupplung zur Stabilisierung des Intermediats *N*-hydroxysuccinimid bzw. *N*-hydroxysulfosuccinimid hinzugegeben.<sup>[75], [78]</sup>

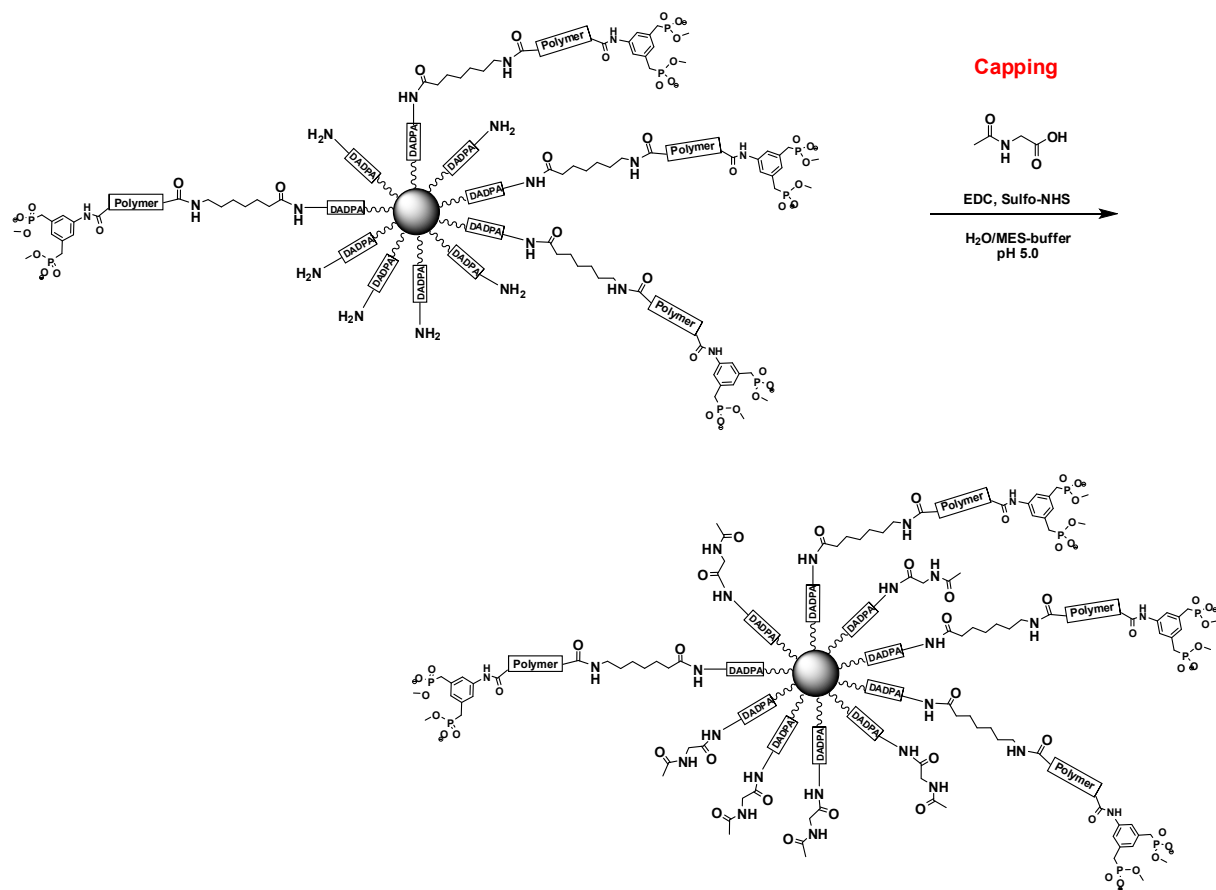
Beide, NHS und Sulfo-NHS, sind löslich in Wasser und organischen Lösemittel, jedoch kommt es zu einer verminderten Wasserlöslichkeit des Intermediates bei Verwendung des NHS. Bei Verwendung von Sulfo-NHS hingegen steigt die Wasserlöslichkeit des Intermediates aufgrund der Sulfonat-Gruppe an, sodass in dieser Arbeit die Wahl auf das teurere Sulfo-NHS fiel. Die Stabilität des Sulfo-NHS Esters richtet sich nach verwendetem Puffer und pH-Wert der Reaktionslösung. NHS Ester haben demnach eine Halbwertszeit von vier bis fünf Stunden bei pH 7, eine Stunde bei pH 8 und ca. 10 Minuten bei pH 8.6.<sup>[78], [79], [80]</sup>



**Abb. 3.4.3:** Reaktionsschema der Immobilisation von Polymer **52** an das Coupling-Gel.

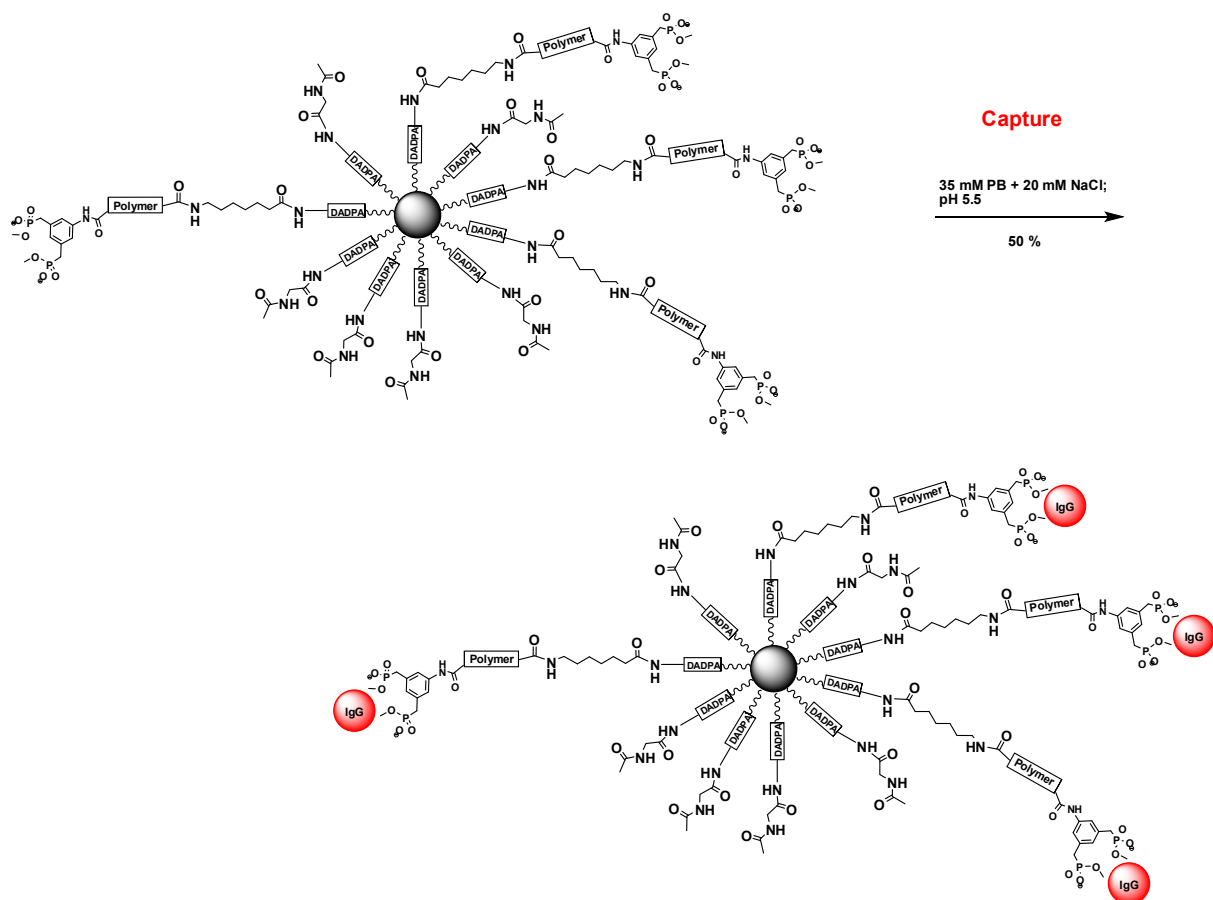
Die Immobilisierungsausbeute wurde über die Abnahme der Dansyl-Fluoreszenz berechnet und zu 16.4 mg Polymer bestimmt. Dies entspricht einer Ausbeute von 80% bezogen auf die freien Säure-Gruppen im Polymer, welche hier den limitierenden Faktor darstellen. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe des fluoreszierenden Polymers erstellt und mit den Fraktionen, welche nach der Säule aufgefangen wurden, verglichen. Die Differenz bildet die Menge an immobilisiertem Polymer.

Anschließend ist ein Capping-Schritt erforderlich, um sämtliche freien Amine auf dem Coupling Gel zu maskieren, damit es nicht zu unerwünschten Wechselwirkungen zwischen den Aminen auf der Oberfläche des Gels und dem zu bindenden Protein kommt; in diesem Fall wurde mit *N*-terminal geschütztem Glycin maskiert.



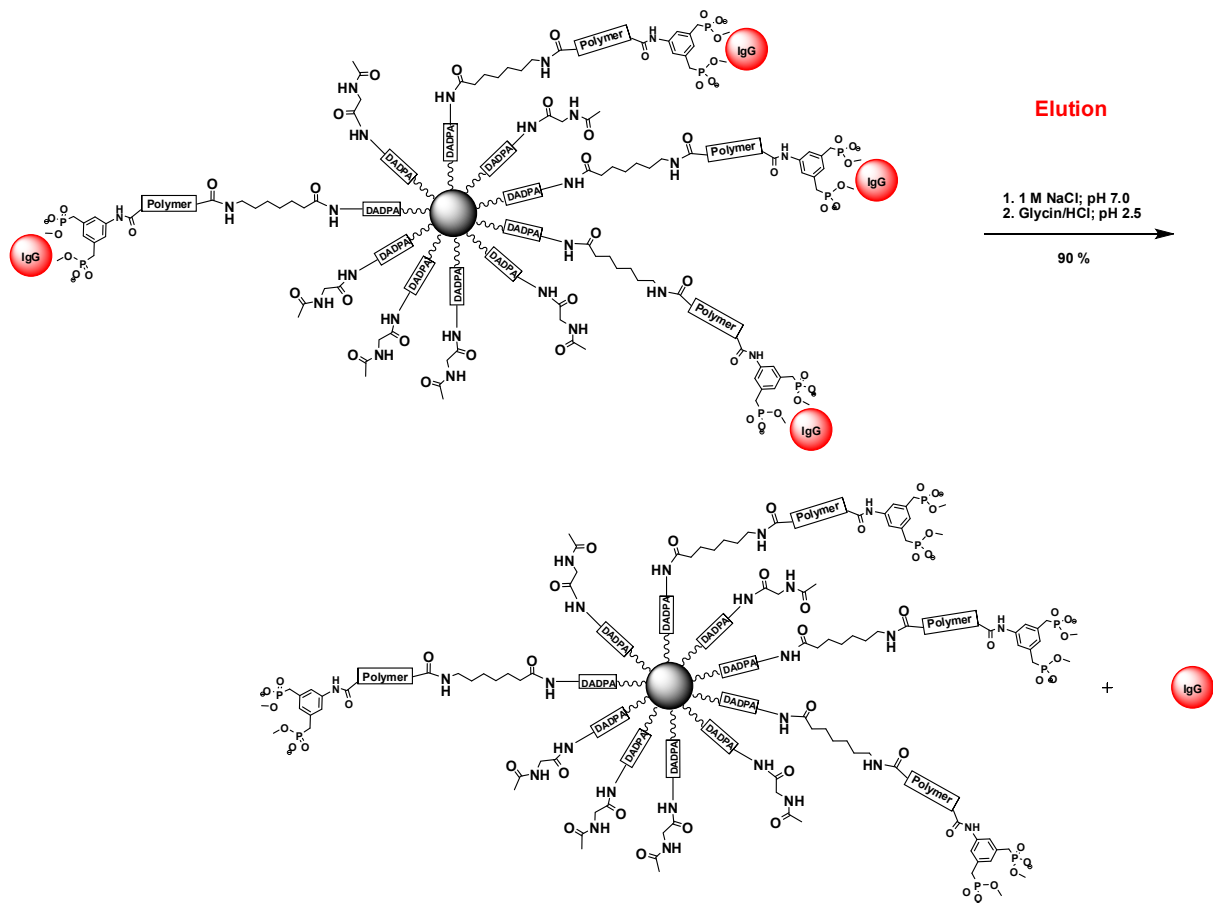
**Abb. 3.4.4:** Reaktionsschema des Capping der freien Amino-Gruppen mit Glycin.

Im Capture-Schritt wurde eine verdünnte Lösung des Antikörpers (1 mg/mL) auf die Säule gegeben, mit dem 10 fachen Säulenvolumen an Puffer (35 mM PB + 20 mM NaCl) gewaschen und die Menge an ungebundenem Protein bestimmt (Tryptophan-Fluoreszenz). Von insgesamt 8 mg des angebotenen Antikörpers wurden 4 mg (50%) vom immobilisierten Affinitätspolymer gebunden. Dies ergibt eine effektive Kapazität von 27.7 nmol IgG/mL Harz, was einer Ausbeute von 33%, bezogen auf die Polymerbeladung des Harzes, entspricht.



**Abb. 3.4.5:** Reaktionsschema des „Capture“-Schritts von IgG.

Zur Freisetzung des gebundenen Antikörpers wurde in einem zweistufigen Verfahren zunächst mit 1 M wässrigem NaCl und anschließend mit saurem HCl/Glycin-Puffer (pH 2.5) eluiert. Es konnten 90% des gebundenen Antikörpers zurückgewonnen werden (Tryptophan-Fluoreszenz).



**Abb. 3.4.6:** Reaktionsschema des Elutions-Schrittes mit 1 M NaCl bzw. Glycin/HCl Puffer.

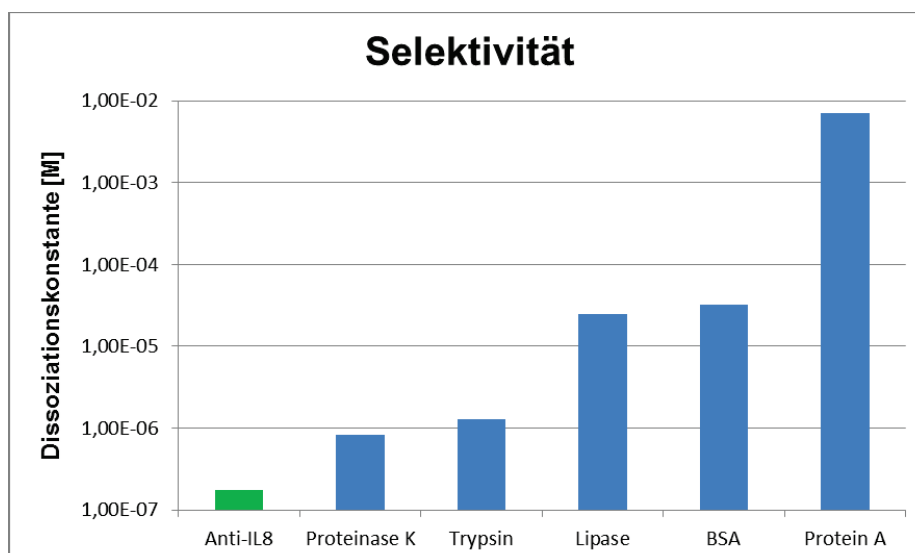
**Tabelle 3.4** zeigt im direkten Vergleich, dass das immobilisierte Affinitätspolymer eine wesentlich höhere Konzentration auf der Trägerphase erreicht als Protein A auf Sepharose, aber vor allem im Capture-Schritt etwa fünf Mal weniger IgG aufnimmt, während die Elution nahezu gleich effizient abläuft. Hier müssen in Zukunft alle Schritte optimiert werden; besonderes Augenmerk verdient der eigentliche Capture-Schritt, dessen Effizienz aber wahrscheinlich von der Zugänglichkeit der Haftgruppen auf dem immobilisierten Affinitätspolymer abhängt.

	Polymer – Coupling Gel	Protein A - Sepharose
Immobilised affinity molecule	16,44 mg (85 nmol)/ 1 mL resin	2 mg (200 nmol) / 1 g Sepharose
Binding Capacity of IgG	4 mg / 1 mL resin	20 mg / 1 mL Sepharose
Elution of IgG	3,6 mg / 1 mL resin	quantitative

**Tabelle 3.4:** Vergleich zwischen dem verwendeten Coupling Gel und Protein A-Sepharose (Benchmark) hinsichtlich Immobilisierungseffizienz, Kapazität und effektiver Ausbeute an IgG.

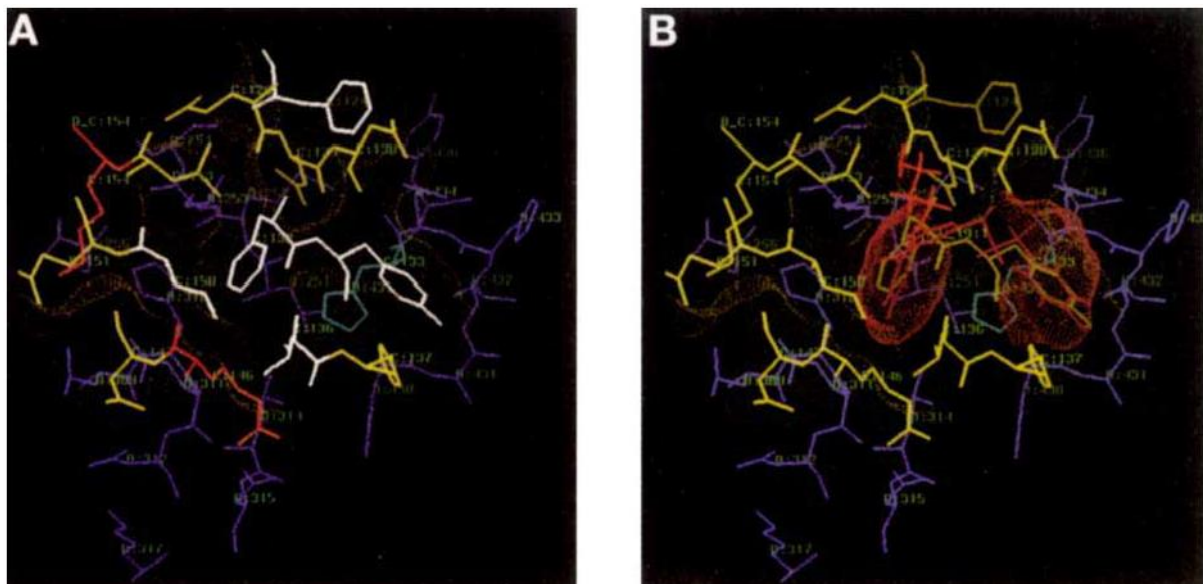
### 3.5 Proteinselektivität

In dieser Arbeit wurden mittels Informationen aus der Kristallstruktur des IgG/Protein A Komplexes Polymere synthetisiert, welche auf Grund des individuellen Designs in der Lage sind mit größerer Affinität an das IgG-Molekül zu binden als z.B. an BSA. Es wurden nach sorgfältiger Analyse der Protein A-Bindungsstelle Monomere komplementär zur Proteinoberfläche ausgewählt. Einer dieser Bausteine, welcher einen zentralen Beitrag zur Selektivität aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Phe-Tyr-Sequenz des Protein A-Liganden leisten soll, ist das ApA-Monomer. Polymere mit diesem Rezeptor sollten demnach eine hohe Selektivität für die Protein A-Bindungsstelle besitzen und sind deshalb von großem Interesse. Polymer **46** vereint all diese Eigenschaften. Es bindet mit einer fast 200fach größeren Affinität für Anti-IL8 im Vergleich zu BSA. Darüber hinaus wurde die Affinität des Polymers **46** zu weiteren Proteinen bestimmt, wie z.B. Protein A, Trypsin, Lipase oder Proteinase K. Es stellte sich durch Fluoreszenztitrations heraus, dass keines dieser Proteine in der Lage ist mit einer ähnlich hohen Affinität zu binden, welche sich in der Größenordnung von Anti-IL8 befindet.



**Abb. 3.5.1:** Übersicht der Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung zwischen Polymer **46** und Anti-IL8 (grün) bzw. verschiedenen Proteinen (blau) aus Fluoreszenztitrations.

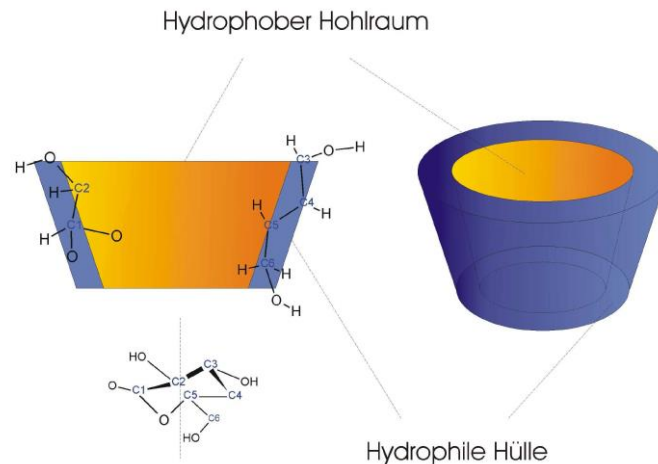
Dies beruht sicherlich zum einen darauf, dass das Polymer **46** mit seinen zahlreichen Phosphonat-Gruppen arginin- und lysinreiche Oberflächen erkennt und demnach bevorzugt basische Proteine komplexiert, wie das Anti-IL8. Es ist weniger geeignet für die sauren Proteine BSA und Protein A, welche einen  $pI$  von ca. 5.5 besitzen und somit weniger Angriffsfläche für das BP-Monomer bieten. Zum anderen erkennt man deutlich den Einfluss des CD- und des ApA-Monomers. Das ApA-Monomer passt perfekt in die hydrophobe Tasche, welche aus den Aminosäuren gebildet wird und ersetzt dort hervorragend die Phe-Tyr-Sequenz des Protein A-Moleküls, die einen zentralen Beitrag zur Protein A/IgG-Bindung leistet.



**Abb.3.5.2:** Interaktion zwischen der B-Domäne von Protein A, dem ApA-Molekül und dem Fc-Teil von IgG. (A) An der Bindung zwischen Protein A (gelb, rot und weiß) und dem Fc-Teil von IgG (violett und hellblau) beteiligte Aminosäurereste. (B) Interaktion zwischen dem Protein A (gelb) und dem Fc-Fragment von IgG (violett) überlagert von dem ApA-Molekül (rot) an der vermeintlichen Bindungsstelle. Rote Punkte repräsentieren die Moleküloberfläche.

Das CD-Monomer hingegen ermöglicht mit seiner hydrophoben Kavität die Bindung an den zahlreich exponierten aromatischen Aminosäureresten rings um dieses hydrophobe Zentrum und leistet somit ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Selektivität des Polymer/IgG-Komplexes.





**Abb. 3.5.3:** Schematischer Aufbau des  $\beta$ -Cyclodextrins. <sup>[81]</sup>

Um die mit Hilfe von Fluoreszenz-Titrations erhaltenen Bindungskonstanten zwischen Polymeren und Proteinen miteinander vergleichen zu können, müssen diese Proteine in Bezug auf ihre Oberfläche analysiert werden. Dies beinhaltet die Anzahl der exponierten negativ und positiv geladenen Aminosäuren, die Größe der hydrophoben und aromatischen Oberflächenanteile, Verteilungsmuster der entsprechenden Aminosäuren mit eventueller Domänenbildung sowie die absolute Oberfläche der einzelnen Proteine. Bindungsstudien und die entsprechende Analyse der Proteinoberfläche sollen mit Rinderserumalbumin, Protein A, Pankreaslipase, Trypsin, Proteinase K und dem Fc-Teil von IgG durchgeführt werden. Für die statistisch, quantitative Analyse bietet sich das Programm Protein Volume Evaluation (PROVE) an. Es berechnet basierend auf dem Survol Algorithmus unter anderem das Volumen jedes einzelnen Atoms eines Proteins und klassifiziert es als Lösungsmittel exponiert oder im Inneren des Proteins gelegen. Für die qualitative Analyse der Proteinoberfläche wurden die Programme Pymol und WebLabViewer verwendet. Da für den experimentell bestimmten pI-Wert der verwendeten Proteine in der Literatur keine oder teilweise sehr unterschiedliche Angaben gefunden wurden, wird der aus der Primärstruktur berechnete pI zur groben Klassifizierung der Proteine verwendet.

Protein	Isoelektrischer Punkt	Molmasse [kD]	Gesamtoberfläche [ $\text{\AA}^2$ ]	Arginine auf der Oberfläche	Lysine auf der Oberfläche	Asp + Glu auf der Oberfläche
BSA	5.82	69.3	28752	22	41	81
Protein A	5.53	55.4	21765	6	17	39
Lipase	5.27	50.1	20653	7	18	41
Prot K	7.7	28.9	10078	9	7	14
Trypsin	8.3	22.0	8610	2	14	9
Fc-Fragment (IgG)	8.46	48.21	19635	6	28	22

**Tabelle 3.5:** Vergleichbare Parameter der Proteine; pI: aus der Primärstruktur berechnet; Anzahl der exponierten basischen Aminosäurereste bezogen auf die Guanidinium- oder Amino-Funktion; Anzahl der exponierten sauren Aminosäurereste bezogen auf die Carboxylat-Gruppe.

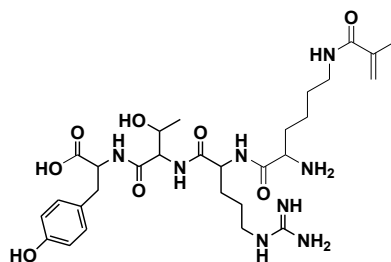
Wie der Vergleich der Isoelektrischen Punkte zeigt, sind nur Proteinase K und Trypsin basische Proteine und besitzen ungefähr dieselbe Anzahl positiver Ladungen auf der Oberfläche. Dies erklärt sehr gut die im Vergleich mit Protein A, BSA und Lipase erhöhten Affinitäten zu Polymer **46**. Da in diesem Vergleich der gesamte Antikörper mit Abstand die größte Oberfläche besitzt, mit einer Molmasse von ca. 144 kDa und einer Gesamtoberfläche von  $3927 \text{ \AA}^2$ , spielen bei der Bildung des Polymer/IgG-Komplexes auch entropische Effekte eine wesentliche Rolle, welche sich hier positiv auf die Bindung auswirken.

Es ist demnach gelungen Polymere herzustellen, welche in wässrig gepufferten Lösungen IgG von Proteinen wie BSA, Protein A, Lipase, Trypsin und Proteinase K unterscheiden können, sodass hier von einer IgG-Selektivität der Polymere gesprochen werden kann.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Neue Monomere für das Protein A – Bindungsepitop

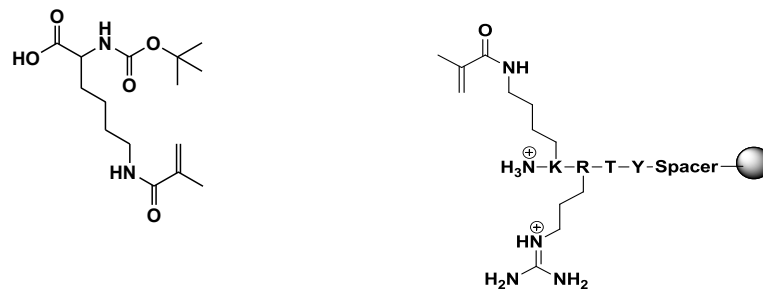
Im Rahmen dieser Dissertation wurden zahlreiche neue epitop-spezifische Haftmonomere für die Protein A-Bindungsstelle entwickelt und synthetisiert. Hierzu gehört unter anderem die gelungene Synthese des YTRK-Monomers, welches die Tyr-Thr-Arg-Sequenz des bereits bekannten „Protein A mimetic peptide dendrimer“ von *Fassina et al* beinhaltet.



17

Abb. 4.1: YTRK-Monomer

Zunächst wurde das Lysin-Monomer durch zwei-stufige Synthese in Lösung hergestellt. Dieses wurde anschließend in der Festphasensynthese als *N*-terminaler Aminosäurebaustein des Tetrapeptids eingesetzt. Im letzten Syntheseschritt wurde das komplett entschützte YTRK-Monomer durch das Behandeln mit 50%iger TFA in 70%iger Reinheit erhalten.



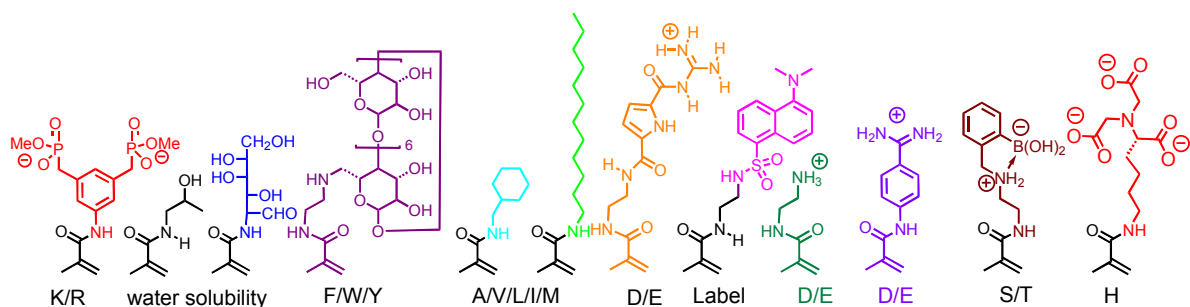
16

**Abb. 4.2:** Lysin-Monomer (links) und die Struktur des YTRK-Monomers (rechts) am Wang-Harz.

Leider verliefen sämtliche Copolymerisationsversuche mit diesem Monomer bisher sehr unvollständig ab (nicht abtrennbare Polymerisationsrückstände >50%), sodass das Projekt daher aufgrund der kosten- und arbeitsintensiven Synthese des Monomers nicht weiter verfolgt wurde.

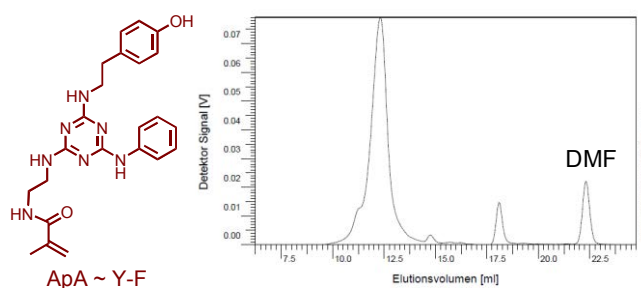
Parallel zu einer kombinatorischen Bibliothek an höheren Affinitätspolymeren aus bereits in unserem Arbeitskreis existierenden Haftmonomeren wurden mehrere neue Monomere entwickelt und synthetisiert. Dazu diente die Kristallstruktur des Protein A/IgG Interfaces als Grundlage.

**Abbildung 4.3** gibt einen repräsentativen Überblick über die wichtigsten Monomerbausteine. Einige dieser Verbindungen dienten als Sonden für bindende Wechselwirkungen mit sauren (D/E) oder hydroxylhaltigen (S/T) Aminosäuren sowie als Fluoreszenzlabel (Dansyl).



**Abb. 4.3:** Haftmonomere auf Methacrylamid-Basis für proteinogene Aminosäuren auf und um die Protein A-Bindungsstelle auf Immunoglobulinen. Die Spezifität der Monomere wird über den Buchstaben-Code für proteinogene Aminosäuren dargestellt.

Zusätzlich zu den beiden in **Abbildung 4.3** gezeigten unpolaren Monomeren für A/V/L/I/M wurde eine ganze Reihe unpolarer Haftmonomere hergestellt. Diese enthielten die Aminosäuren Alanin und Phenylalanin sowie Anilin und Cyclohexylmethylreste. Als Spezialmonomer wurde außerdem ein Mimetikum für die beiden aromatischen Reste Phe-132-Tyr-333 in Protein A synthetisiert; dieses Dipeptid wird bei der IgG-Bindung in der Antikörperoberfläche vergraben und leistet dadurch einen starken Beitrag zur Gesamtbindungsenergie. Die ersten drei seiner 4-stufigen Synthese waren bereits aus der Literatur bekannt. Dieses Monomer wurde mit einer Reinheit von >98% synthetisiert und mit etablierten Monomeren (Bisphosphonat, Dansyl und Glucosyl) copolymerisiert.

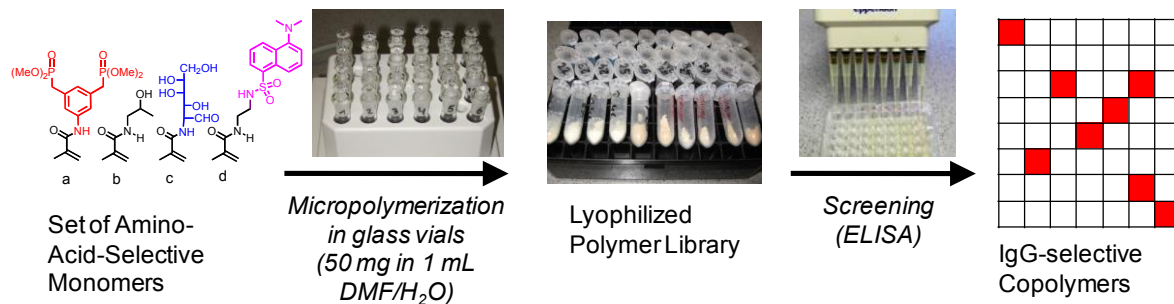


**Abb. 4.4:** Links: ApA-Monomer als Tyr-Phe-Mimetikum; rechts: GPC-Diagramm des daraus hergestellten Copolymers (1 Bisphosphonat-Monomere, 1 Glucosyl-Monomer, 1 ApA-Monomer, 0.5 Dansyl-Monomer).

## 4.2 Parallele Mikro- und Mini-Polymerisation

Es wurde ein optimiertes Polymerisationsverfahren entwickelt, bei dem sämtliche neuen Monomere mit den Standard-Monomeren (Bisphosphonat, Dansyl, Glucosyl und Dodecyl) in DMF-Wasser copolymerisiert wurden. Anschließend Entfernung des Lösungsmittels und präparative Ultrafiltration mit 3 kD cut-off-Filtern ergaben gereinigte monomerfreie Polymere, welche zu farblosen feinen Pulvern lyophilisiert

wurden. NMR-Spektren zeigten über ihre NMR-Integrale die Einbauraten im Polymer an sowie die vollständige Abwesenheit von Monomeren (Doppelbindungssignale bei 5-6 ppm). Die Molekulargewichte wurden je nach Initiatorkonzentration per GPC zu 3 kD bis 200 kD bestimmt.



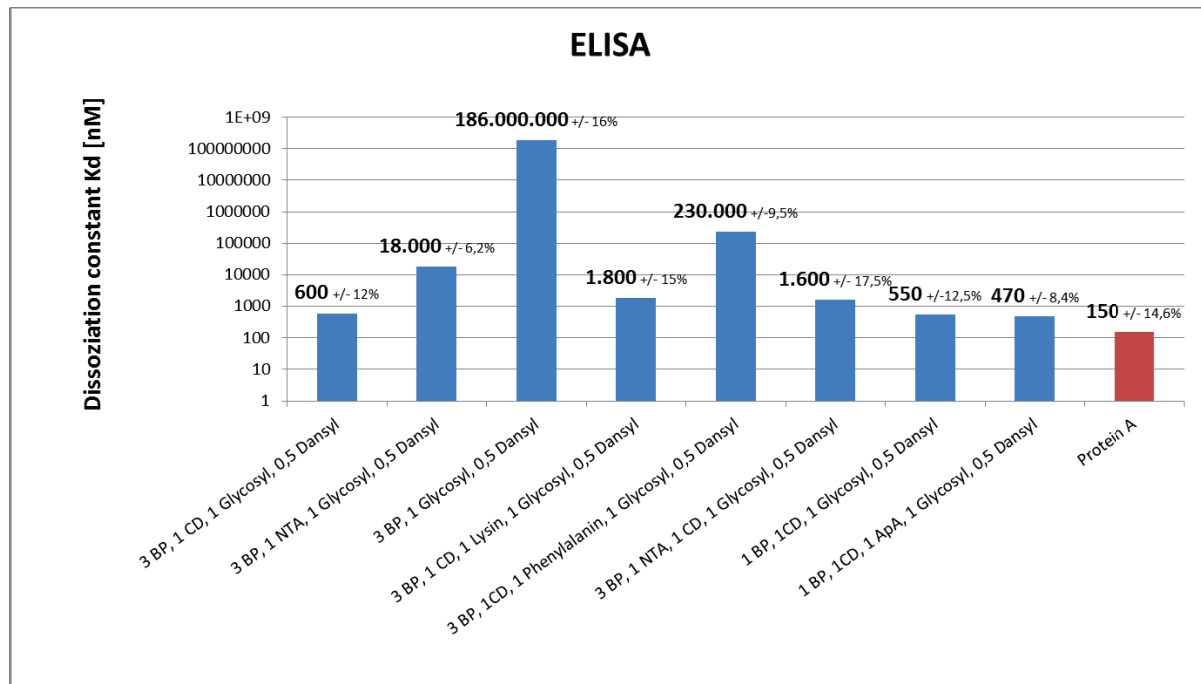
**Abb. 4.5:** Optimiertes Verfahren zur Minipolymerisation und Gefriertrocknung mit anschließendem ELISA-Screening zur Identifikation der besten Binder auf der Protein-A Bindungsstelle am IgG.

Insgesamt wurden im Zeitraum dieses Projekts 53 Affinitätspolymere mit unterschiedlichsten Monomerzusammensetzungen und Molekulargewichten generiert, vollständig charakterisiert und mittels ELISA-Technik und Fluoreszenztitration auf IgG-Affinität getestet.

### 4.3 Screening

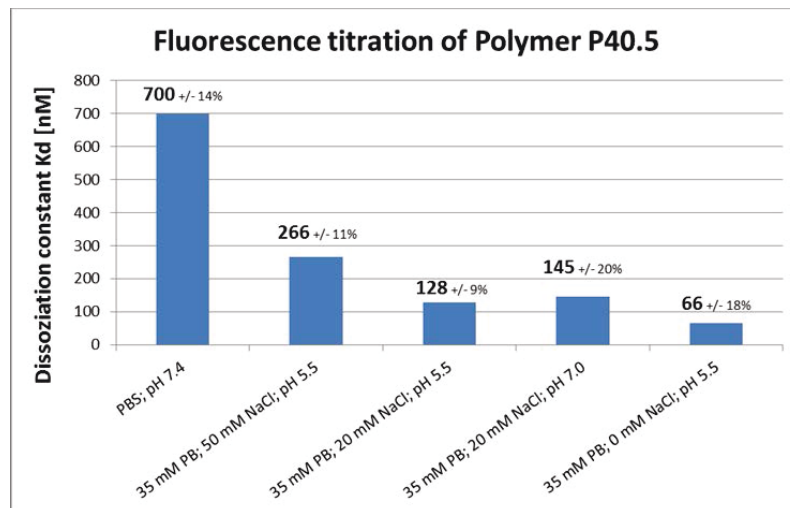
Zur Affinitätsbestimmung der Polymere an die Protein-A-Bindungsstelle wurde ein ELISA etabliert, welcher das Prinzip der Konkurrenz zwischen den Affinitätspolymeren und Protein A am IgG ausnutzt. Mit Hilfe dieses ELISAs wurden die oben genannten kleinen Bibliotheken von Copolymeren auf ihre Affinität zum IgG hin untersucht. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven ELISA, welcher es ermöglicht Bindungskonstanten zwischen Polymer und Anti-IL8 in **physiologischer Lösung** zu bestimmen. Das Polymer konkurriert dabei mit dem Protein A um die Bindung am Antikörper. Das Ergebnis dieses Screenings ergab, dass lediglich wenige Polymere in der Lage sind diese Anforderungen zu bewältigen. Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten einiger Polymere zeigt deutlich die Notwendigkeit des

Bisphosphonats bzw. des NTAs und des Cyclodextrins im Polymer an, um Protein A von der Proteinoberfläche des IgG-Moleküls zu verdrängen.



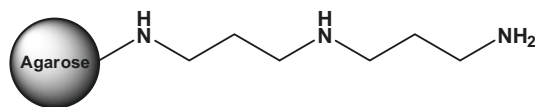
**Abb. 4.6:** Übersicht der Dissoziationskonstanten aus ELISA-Messungen einiger Polymere (blau) im Vergleich zu Protein A (rot).

Durch Fluoreszenztitrationsen konnten schließlich Dissoziationskonstanten in Abhängigkeit der Salzkonzentration und des vorherrschenden pH-Wertes gemessen werden. Bei sinkendem Salzgehalt steigt die IgG-Affinität des Polymers deutlich und zeigt dadurch eine starke Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen an. Dem entgegen steht allerdings eine auffällig geringe Abhängigkeit des pH-Wertes. Bei pH 5.5 werden z.B. die Histidine im Protein protoniert, welche dann über Carboxylate im Polymer gebunden werden können. Ein solcher Effekt spielt bei diesem Polymer allerdings nur eine untergeordnete Rolle, sodass man nicht von einer rein elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Polymer und dem Protein II-8 sprechen kann, vielmehr sind individuelle Wechselwirkungen der einzelnen Monomerbausteine bzw. das Zusammenspiel der einzelnen Monomerbausteine für eine recht starke Bindung an der Proteinoberfläche verantwortlich.



**Abb. 4.8:** Übersicht der Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung zwischen IgG und einem Affinitätspolymer aus Fluoreszenztitrationen: Polymer P40.5 (1 BP; 1CD; 1 Glucosyl; 0.5 Dansyl).

Schließlich wurde das Polymer mit der besten Affinität für Anti-IL8 (Polymer **P40.5**) auf einer festen Phase (Agarose) mittels EDC-Kupplung immobilisiert. Hierfür war es allerdings notwendig das Polymer **P40.5** ein wenig zu modifizieren, indem die gleiche Monomermischung mit 5% eines Monomers aus Aminohexansäure und Methacrylsäure (Hydroxycarbonylheptylmethacrylamid) copolymerisiert wurde. Das neue Copolymer mit freien Carbonsäuregruppen wurde anschließend peptidisch an eine Aminophase gekuppelt. Dabei handelt es sich um ein quervernetztes Agarose-Harz, welches mit Diaminodipropylamin (DADPA) funktionalisiert wurde (CarboxyLink<sup>TM</sup> Coupling Gel).



**Abb. 4.9:** Struktur des CarboxyLink<sup>TM</sup> Coupling Gels.

Durch EDC-Kupplung der Carbonsäure mit den freien Amino-Gruppen auf dem Harz konnte eine stabile Polymer-Phase erzeugt werden, welche es nun ermöglicht gelöstes Immunglobulin G aus wässrigen Puffern mit einer Kapazität von 4 mg IgG / 1 mL Polymer-Phase zu extrahieren. Der anschließende Elution-Schritt erbrachte 90% des gebundenen Antikörpers zurück.



	Polymer – Coupling Gel	Protein A - Sepharose
Immobilised affinity molecule	16,44 mg (85 nmol)/ 1 mL resin	2 mg (200 nmol) / 1 g Sepharose
Binding Capacity of IgG	4 mg / 1 mL resin	20 mg / 1 mL Sepharose
Elution of IgG	3,6 mg / 1 mL resin	quantitative

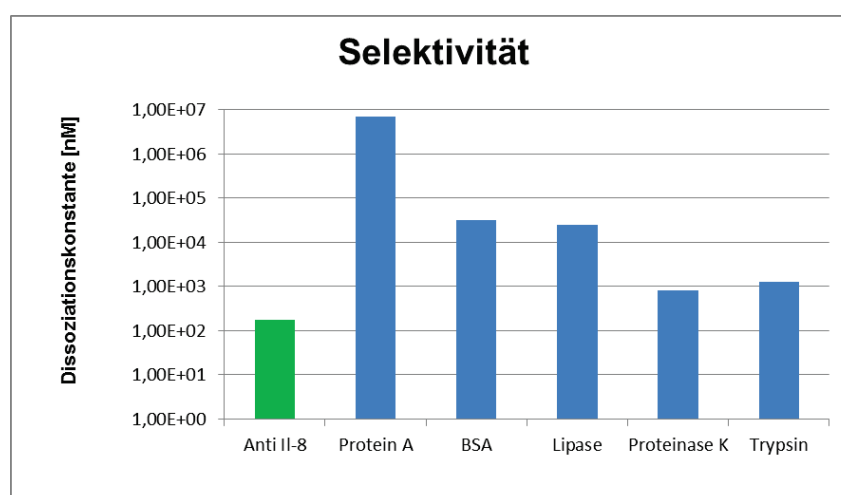
**Tabelle 4.1:** Vergleich zwischen dem verwendeten Coupling Gel und Protein A-Sepharose (Benchmark) hinsichtlich Immobilisierungseffizienz, Kapazität und effektiver Ausbeute an IgG.

**Tabelle 4.1** zeigt im direkten Vergleich, dass das immobilisierte Affinitätspolymer eine wesentlich höhere Konzentration auf der Trägerphase erreicht als Protein A auf Sepharose, aber vor allem im Capture-Schritt etwa fünf Mal weniger IgG aufnimmt, während die Elution nahezu gleich effizient abläuft. Hier müssen in Zukunft alle Schritte optimiert werden; besonderes Augenmerk verdient der eigentliche Capture-Schritt, dessen Effizienz aber wahrscheinlich von der Zugänglichkeit der Haftgruppen auf dem immobilisierten Affinitätspolymer abhängt. Hier war es leider nicht möglich, aufgrund unzureichender Mengen an immobilisiertem Polymer **P40.5** die Selektivität im Capture-Schritt gegenüber anderen Proteinen wie z.B BSA zu bestimmen.

Jedoch wurden gleichzeitig das Bisphosphonat-Monomer, das NTA-Monomer und das Cyclodextrin-Monomer im Rahmen des BMBF-Projekts an den Arbeitskreis *Ulbricht* weitergegeben und dort als Membranadsorber eingesetzt. *Schwark* gelang es mit einer ähnlichen Monomierzusammensetzung wie Polymer P40.5 membrangebundene Polymere herzustellen, die im Capture-Schritt mit einer hohen Selektivität den IL8-spezifischen Antikörper binden und somit diesen effektiv im Zelllysate anreichern konnten.

## 4.4 Selektivität

Die Selektivität für Anti-IL8 konnte anhand von Polymer **46** erfolgreich durch Fluoreszenztitrationen nachgewiesen werden. Polymer **46** zeigt eine 200fach größere Affinität für Anti-IL8 im Gegensatz zu BSA. Auch weitere Proteine wie zum Beispiel Protein A, Lipase und Trypsin werden deutlich schwächer gebunden. Lediglich Proteinase K besitzt eine annähernd große Affinität für Polymer **46**. Leider reichten die Mengen an Polymer **46** nicht aus um dieses an der festen Phase zu immobilisieren, um anschließend



**Abb. 4.10:** Übersicht der Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung zwischen Polymer **46** und Anti-IL8 (grün) bzw. verschiedenen Proteinen (blau) aus Fluoreszenztitrationen.

## 4.5. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bibliotheken an antikörperselektiven Affinitätspolymeren erstellt, welche sich signifikant in Ladung und Hydrophilie unterscheiden. Sämtliche Vertreter wurden systematisch in vergleichenden Experimenten als Testplattform für die molekulare Erkennung von Immunglobulinen in Lösung untersucht.

Als Grundlage für das Polymer-Design diene die Kristallstruktur des Protein A/IgG Interfaces, welches sich als sehr komplex herausstellte. In weiteren Arbeiten kann zum einen genau dieses Epitop genauer untersucht werden, indem durch Molecular Modelling ein ideales Polymer komplementär zum Epitop generiert wird, welches in der Lage ist die wichtigsten Aminosäuren zu erkennen und zu binden. Zum anderen ist es nicht ausgeschlossen, dass sich weitere Bereiche auf dem IgG-Molekül finden lassen, die für eine Bindung ausgenutzt werden können.

Ein völlig anderer Ansatz, um ein nahezu genau passendes Polymer zu generieren, ist es die Methode des Protein-Imprinting zu nutzen, welche bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Sellergren* in Form eines sogenannten Epitop-Imprinting eingesetzt wurde. Im Gegensatz zum Epitop-Imprinting, bei dem durch Einsatz von Peptidtemplatzen ein dreidimensionales komplementäres Polymernetzwerk aufgebaut wird, könnte man in Zukunft versuchen ein sogenanntes „1D-Imprinting“ zu realisieren. Hierbei wird zunächst das gewünschte Protein auf einer festen Oberfläche immobilisiert und anschließend mit einer Reihe unterschiedlicher Haftmonomere beladen. Diese angebotenen Monomere können dann auf der Proteinoberfläche gemäß ihrer Ladung/Hydrophilie binden, wodurch eine individuelle/optimale Verteilung der Monomere generiert wird. Nicht gebundene Monomere werden einfach in einem Wasch-Schritt von der festen Phase gewegewaschen. Im nächsten Schritt wird dem Ganzen ein Radikalstarter zugesetzt, wodurch die einzelnen gebundenen Monomere zu einem Polymer umgesetzt werden. Entfernt man nun das Protein, erhält man ein Polymer, dessen Bindungsstellen in ihrer Anordnung nun konserviert sind. Diese geprägten Polymere können dann effektiv zur Erkennung des prägenden Proteins genutzt werden, wodurch Affinität als auch Selektivität gegenüber dem Protein in erheblichem Maße gesteigert werden sollten.

Weiteres Potential zur Optimierung steckt in der Immobilisierung der Polymere auf einer festen Phase wie z.B. Agarose. Besonderes Augenmerk muss hier auf den Capture-Schritt gelegt werden, dessen Effizienz durch eine bessere Zugänglichkeit der Haftgruppen des immobilisierten Affinitätspolymers gesteigert werden kann. Dies kann zum einen durch eine geringere Konzentration der copolymerisierten Carbonsäure erfolgen, sodass sich im besten Fall nur eine einzelne

Carbonsäureeinheit pro Polymer-Molekül befindet. Das hat zur Auswirkung, dass das immobilisierte Polymer seine Flexibilität behält, die es benötigt um das Protein effektiv zu binden, da es nur an einem Punkt an dem Harz befestigt wird. Zum anderen kann ein Carbonsäure-Monomer verwendet werden, dessen Linker zwischen Säure-Gruppe und Polymerrückgrad eine maximale Länge aufweist bei gleichzeitig guter Wasserlöslichkeit. Damit wird eine größtmögliche Zugänglichkeit für die Haftgruppen des Polymers realisiert. Auch das Quellverhalten des verwendeten Harzes bzw. die Anzahl und Anordnung der funktionellen Gruppen auf dem Harz spielen für die Zugänglichkeit der Haftgruppen im Capture-Schritt eine entscheidende Rolle. Hier muss in Zukunft geprüft werden, ob man vielleicht geeignetere Phasen zur Immobilisierung findet, welche obige Eigenschaften perfektionieren.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden über die Firmen *Acros Organics* (Geel, Belgien), *Aldrich Chemical Co.* (Taufkirchen, Deutschland), *Bachem* (Bubendorf, Schweiz), *Merck Millipore* (Billerica, Massachusetts), *Pierce Biotechnology* (Rockford, Illinois) und *Fluka* (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und falls nicht anders angegeben in den erhaltenen Qualitäten *purris.*, *purrum* oder *p.a.* eingesetzt.

#### 5.1.2 Lösungsmittel

Die eingesetzten Lösungsmittel wurden in den Qualitäten *purris.* und *anhydrous* erworben und über Molsieb gelagert, Lösungsmittel technischer Qualität wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach bekannten Standardmethoden absolutiert.<sup>[85], [86]</sup> Das eingesetzte Wasser war entionisiert und wurde im Bedarfsfall nochmals über eine Purelab UHQ Anlage (ELGA Berkefeld GmbH, Celle) entionisiert.

#### 5.1.3 Gefriertrocknung

Für die Gefriertrocknung der Polymere und wasserhaltiger Proben wurde die Gefriertrocknungseinheit Alpha 2-4 LSC der Firma *Christ* verwendet.

#### 5.1.4 Chromatographische Methoden

##### Dünnschichtchromatographie (DC):

Bei allen dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrollen dienten Kieselgel-Platten (Polygram® SIL G/UV<sub>254</sub> bzw. Alugram® SIL G/UV<sub>254</sub>) mit Fluoreszenzindikator der Firma *Roth* als stationäre Phase. Dabei erfolgte die Detektion im UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm und 366 nm bzw. durch Anfärben

mit CAM-Reagenz (2 g Cersulfat, 50 g Ammoniummolybdat und 50 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 400 mL dest. Wasser), Ninhydrin-Reagenz (0.3 g Ninhydrin, 3 mL Eisessig, 100 mL Ethanol) <sup>[85]</sup> oder Ehrlichs-Reagenz (0.5 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd, 25 mL 36%ige HCl, 25 mL 96%iges Ethanol) <sup>[87]</sup>.

#### Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (230 – 400 mesh ASTM) der Firma *Merck*. Lösungsmittelgemische, die für die Chromatographie verwendet wurden, sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

#### Gelpermeationschromatographie (GPC):

Bei der Gelpermeationschromatographie kam neben einer Pumpe *Jasco* PU-980 ein RI-Detektor *Jasco* RI-930 zum Einsatz. Als Säulen wurden zwei HEMA-Bio-Linear 300 x 80 mm für anionische Proben verwendet und zwei PSS NOVEMA Max für kationische Proben.

#### HPLC:

Die HPLC wurde auf einem System der Marke *Dionex*, bestehend aus einer P680 HPLC Pump Anlage und einem UVD 3404 System durchgeführt. Als Säule wurde eine RP 18 YMC Säule im Format 250 \* 4.6 mm mit einer Porengröße von 12 nm und einer Partikelgröße von 5  $\mu\text{m}$  verwendet.

### **5.1.5 Spektroskopische Methoden**

#### Kernresonanzspektroskopie:

Die 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR Spektren, sowie die 75 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden auf einem *Bruker* DMX 300 angefertigt. Die 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR Spektren, sowie die 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren und sämtliche DEPT, COSY, NOESY, HSQC, HMBC und HMQC Spektren wurden auf einem *Bruker* DRX 500 durchgeführt. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen des verwendeten deuterierten Lösungsmittels bei  $^1\text{H}$ -NMR Spektren [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ,  $\delta([\text{d}_6]\text{-DMSO}) = 2.50$ ], und ihre  $^{13}\text{C}$  Resonanzsignale bei  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ;  $\delta([\text{d}_6]\text{-DMSO}) = 39.52$ ]. In der Auswertung werden folgende Abkürzungen für die

Signalmultiplizitäten verwendet: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = breites Signal, dt = Dublett vom Triplett, qt = Quintett. Die Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert, wobei die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale, soweit vorhanden, mittels Literatur erfolgte<sup>[88]</sup>.  $^{13}\text{C}$  Spektren der im Arbeitskreis bereits bekannten Verbindungen wurden nicht gemessen.

#### Massenspektroskopie:

Die Massenspektroskopischen Untersuchungen (ESI) erfolgten an einem *Bruker* BioTOF III. Bei der jeweiligen Auswertung ist als Molekülpeak M die neutrale Verbindung ohne Gegenion angegeben.

#### UV/Vis-Spektroskopie:

UV/Vis-Spektren wurden mit einem Mikrotiterplattenreader Infinite M 200 der Firma *Tecan* bei 25°C gemessen.

Für Absorptionsmessungen der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) wurde eine Temperatur von 38°C verwendet.

#### Fluoreszenzspektroskopie:

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Spectrofluorometer FP-6500 der Firma *Jasco* gemessen. Die Temperierung erfolgte mit einem dazugehörigen Pelletier-Element.

### **5.1.6 Verwendete Puffer**

#### PBS-Puffer:

Für die Experimente zur Bestimmung der Affinitäten in Konkurrenz zu Protein A mittels ELISA wurde PBS-Puffer (*Phosphate buffered saline*) verwendet. Dieser wurde in 10 facher Konzentration hergestellt und vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser entsprechend verdünnt und anschließend mit 1 M Salzsäure auf pH = 7.4 eingestellt, sodass eine Endkonzentration von 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  erreicht wurde.

PBS-B-Puffer:

Dieser Puffer wurde aus dem oben genannten PBS-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an BSA (*Bovine serum albumin*) hergestellt. Eine 3%ige Puffer-Lösung diente als Blocking-Puffer im ELISA. Eine 0.1%ige Puffer-Lösung diente zum Lösen der Polymere und des mit Biotin gelabelten IL8 Antikörpers im ELISA.

Carbonat/Bicarbonat-Puffer:

Zum Lösen des Protein A wurde Carbonat/Bicarbonat-Puffer verwendet. Dieser wurde über *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* als Standard-Pack bezogen. Eine Kapsel, gelöst in 100 mL entionisiertes Wasser ergibt einen 0.1 M Natriumcarbonat/Bicarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9.6.

Phosphat-Citrat-Puffer:

Zum Lösen des Substrates *o*-Phenylendiamin im Immunoassay wurde ein 0.1 M Phosphat-Citrat-Puffer verwendet. Dieser wurde über *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* als Standard-Pack bezogen. Eine Kapsel, gelöst in 100 mL entionisiertes Wasser ergibt einen 0.1 M Phosphat-Citrat Puffer mit einem pH-Wert von 5.0.

Phosphat-Puffer:

Für die Fluoreszenztitrationsen und für den Capture-Schritt wurden 25 mM Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen ( 0 – 75 mM ) verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7.0 bzw. auf 5.5 eingestellt.

MES-Puffer:

Für die Immobilisierung mittels EDC wurde MES-Puffer (2-[*N*-Morpholino]-ethansulfonsäure) verwendet. Dieser wurde über *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* als Standard-Pack bezogen. Eine Tablette, gelöst in 100 ml entionisiertes Wasser ergibt einen 0.1 M Natrium-MES-Puffer mit einem pH-Wert von 4.7.

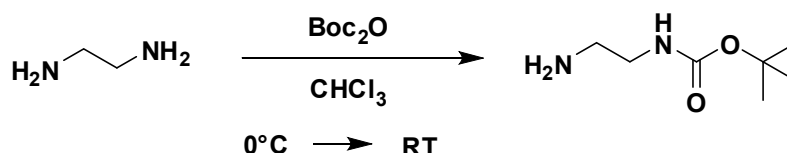
Glycin-HCl-Puffer:

Für den Elutions-Schritt wurde ein 0.1 M Glycin-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 2.0 verwendet.



## 5.2. Synthese der Monomer - Bausteine

### 5.2.1 *tert*-Butyl-2-aminoethylcarbamate<sup>[89]</sup>

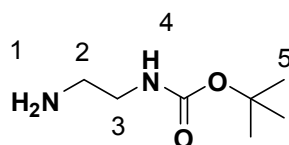


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Ethylendiamin	60.1	9.0	412	24.8	27.5
$\text{Boc}_2\text{O}$	218.3	1.0	45.8	10.0	
$\text{CHCl}_3$					280

#### Durchführung:

27.5 mL Ethylendiamin (412 mmol, 9.0 eq.) wurden in 200 mL Chloroform vorgelegt und mit Hilfe eines Eisbades auf ca.  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. 10 g DiBoc wurden in 80 mL Chloroform gelöst und langsam unter Rühren hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Chloroform unter vermindertem Druck entfernt, wodurch ein weißes Öl zurückblieb. Dieses wurde in 100 mL dest. Wasser aufgenommen und mit Dichlormethan (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Es konnten 7.049 g (43.89 mmol) eines gelblichen Öls isoliert werden.



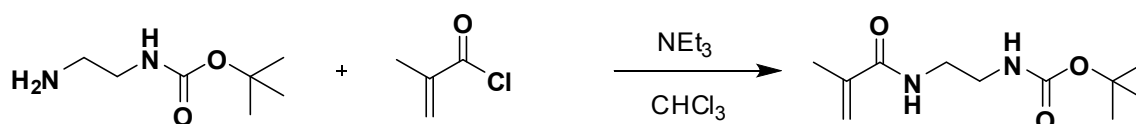
**Ausbeute:** 7.05 g, 96%

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.43 (s, 9H, H-5), 2.78 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, H-2), 3.15 (q, 2H, H-3), 4.61 (brs, 1H, NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 26.4, 40.2, 41.8, 76.4, 154.6.

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ :  $m/z$  183.111, gef.: 183.112.

### 5.2.2 *tert*-Butyl-2-methacrylamidoethylcarbamate



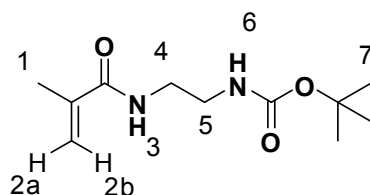
#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>tert</i> -Butyl-2-aminoethylcarbamate	160.21	1.0	43.89	7.05	
Triethylamin	101.19	2.9	127.28	12.88	17.8
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.1	46.52	4.92	4.6
Chloroform					135

#### Durchführung:

Der Ester (7.049 g, 43.89 mmol) und Triethylamin (12.88 g, 127.28 mmol) wurden in 80 mL Chloroform gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Eine Lösung von Methacrylsäurechlorid (4.92 g, 46.52 mmol) in 55 mL Chloroform wurde innerhalb von 2h unter Rühren zu der Reaktionslösung hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde nach beendeter Zugabe auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 2h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit dest. Wasser (5 x 80 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet.

und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es konnten 9.99 g (43.64 mmol) eines klaren Öls isoliert werden.

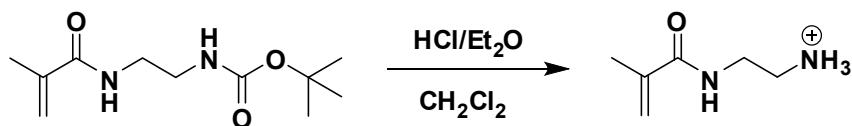


**Ausbeute:** 9.99 g, 99%

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.44 (s, 9H, H-7), 1.96 (t,  $J$  = 1.2 Hz, 3H, H-1), 3.33 (m, 2H, H-5), 3.41 (m, 2H, H-4), 4.9 (brs, 1H, NH), 5.32 (t,  $J$  = 1.5, 1H, H-2a), 5.75 (s, 1H, H-2b), 6.68 (brs, 1H, NH).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ :  $m/z$  251.137, gef.: 251.139.

### 5.2.3 *N*-(2-aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid

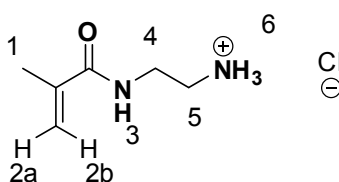


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>tert</i> -Butyl-2-methacrylamidoethylcarbamate	228.29	1	43.64	9.99	
2 M HCl/Et <sub>2</sub> O					70 ml
Dichlormethan					70 ml

**Durchführung:**

*tert*-Butyl-2-methacrylamidoethylcarbamate (9.99 g, 43.64 mmol) wurde in 70 mL Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit einer 2 M HCl/Et<sub>2</sub>O Lösung (70 mL) versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung für weitere 24h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es konnten 5.55 g *N*-(2-aminorthyl)methacrylamid Hydrochlorid (43.0 mmol) als weißer, stark hygroskopischer Feststoff isoliert werden.

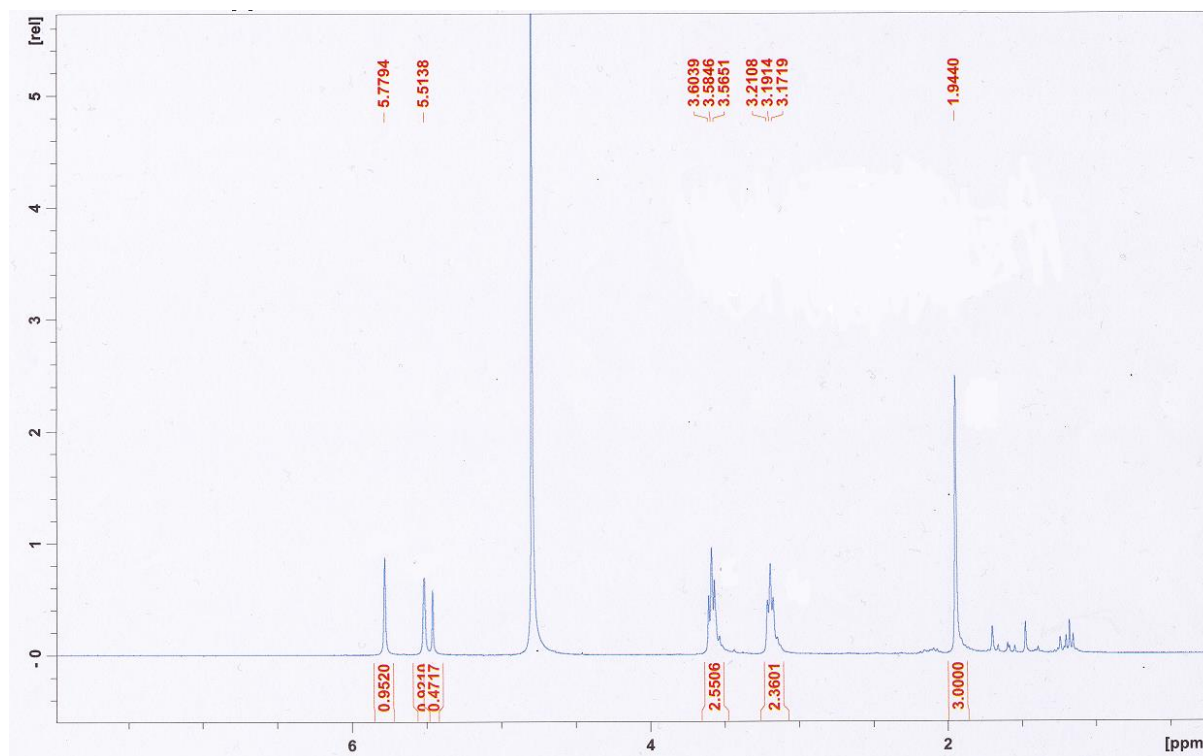


**Ausbeute:** 5.55 g, 98%

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 1.94 (s, 3H, H-1), 3.19 (t, J = 6 Hz, 2H, H-5), 3.58 (t, J = 6 Hz, 2H, H-4), 5.51 (s, 1H, H-2a), 5.78 (s, 1H, H-2b).

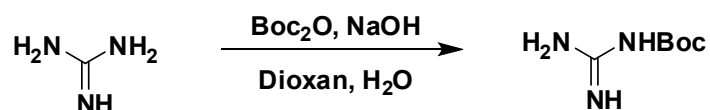
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 19.7, 43.2, 1120.4, 141.2, 169.8.

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>ONa: m/z 129.1028, gef.: 129.1047.



**Abb. 5.1:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von *N*-(2-aminorthyl)methacrylamid Hydrochlorid.

### 5.2.4 N-Boc-Guanidin

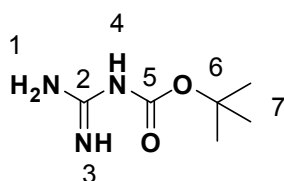


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Guanidiniumhydrochlorid	95.53	5.0	275	26.3	
Natriumhydroxid	40.0	5.5	300	12.0	
Boc <sub>2</sub> O	218.25	1.0	55	12.0	
dest. Wasser					55
Dioxan					100

#### Durchführung:

12 g NaOH (300 mmol, 5.5 eq) und 26.3 g Guanidiniumhydrochlorid (275 mmol, 5.0 eq) wurden in 55 mL Wasser gelöst und mit Hilfe eines Eisbades gekühlt. 12.03 g Di-*tert*-butyldicarbonat (55 mmol, 1.0 eq) wurden in 100 mL Dioxan gelöst und langsam innerhalb von 9h unter Rühren zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für weitere 24h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es verblieben 8.8 g N-Boc-Guanidin (55 mmol, quant.) als farbloser Feststoff.



**Ausbeute:** 8.8 g, quantitativ

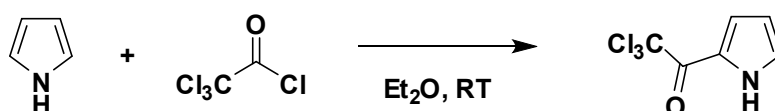
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.25 (DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N = 5 : 1 : 1%)

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.33 (s, 9H, H-7), 6.73 (brs, 4H, H-1, H-3, H-4).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.3 (C-7), 75.3 (C-6), 162.6 (C-5), 163.2 (C-2).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ :  $m/z$  182.0900, gef.: 182.0889.

### 5.2.5 Trichloracetylpyrrol



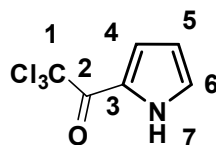
#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Trichloracetylchlorid	181.83	1.1	308	56.3	34.7
Pyrrol	67.09	1.0	288	19.3	19.9
Kaliumcarbonat	138.21	0.6	180.9	25.0	
Aktivkohle					
Diethylether					75.0

#### Durchführung:

Zu einer Lösung aus 34.7 mL Trichloracetylchlorid (56.3 g, 308 mmol) in 55 mL Diethylether abs. wurden 19.85 mL frisch destilliertes Pyrrol (19.3 g, 288 mmol) innerhalb von 3h unter Rühren zugetropft und nach beendeter Zugabe 1h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisieren mit einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung (25 g, 180.9 mmol in 75 mL Wasser), wurde die organische Phase abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Diese wurde anschließend mit Aktivkohle versetzt, 10 min gerührt, über Celite filtriert und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Umkristallisation aus

*n*-Hexan konnten 26.23 g eines dunkel grauen Feststoffs (123.5 mmol, 43%) erhalten werden.



**Ausbeute:** 26.23 g, 43%

**Schmelzpunkt:** 75 °C

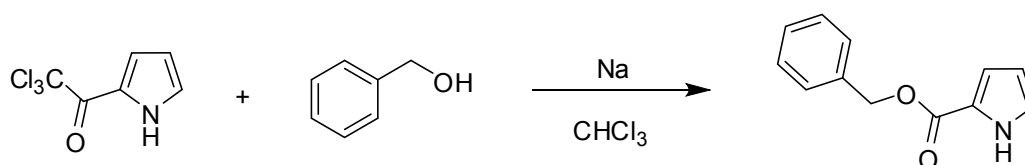
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.49 (Dichlormethan)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 6.37-6.34 (m, 1 H, H-5), 7.16-7.17 (m, 1 H, H-4), 7.38-7.40 (m, 1 H, H-6), 9.51 (brs, 1 H, H-7).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 95.1 (C-1), 112.0 (C-5), 121.3 (C-4), 123.1 (C-3), 127.2 (C-6), 173.3 (C-2).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>NO: m/z 209.9361, gef.: 209.9358.

### 5.2.6 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester

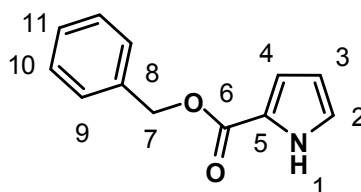


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Trichloroacetylpyrrol	212.46	1.0	123.5	26.23	
Benzylalkohol	107.13	1.1	136.3	14.60	14.1
Natrium	22.99	0.2	24.8	0.57	
Chloroform					27.0

**Durchführung:**

Eine Natriumbenzylat-Lösung, hergestellt aus 0.57 g Natrium (24.8 mmol) gelöst in frisch destilliertem Benzylalkohol, wurde zu einer Lösung aus 26.23 g Trichloracetylpyrrol (123.5 mmol) in 27 mL Chloroform zugetropft. Die dunkle Reaktionslösung wurde für 1h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 1 M Salzsäure (26 mL, 26.0 mmol, 0.2 eq.) unter Rühren versetzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die zurückbleibende wässrige Lösung wurde nach Zugabe von weiteren 50 mL Wasser lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70 : 15 : 15). Es wurden 24.26 g 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (120.6 mmol, 98%) als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 24.26 g, 98%

**Schmelzpunkt:** 55°C

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.55 (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70 : 15 : 15)

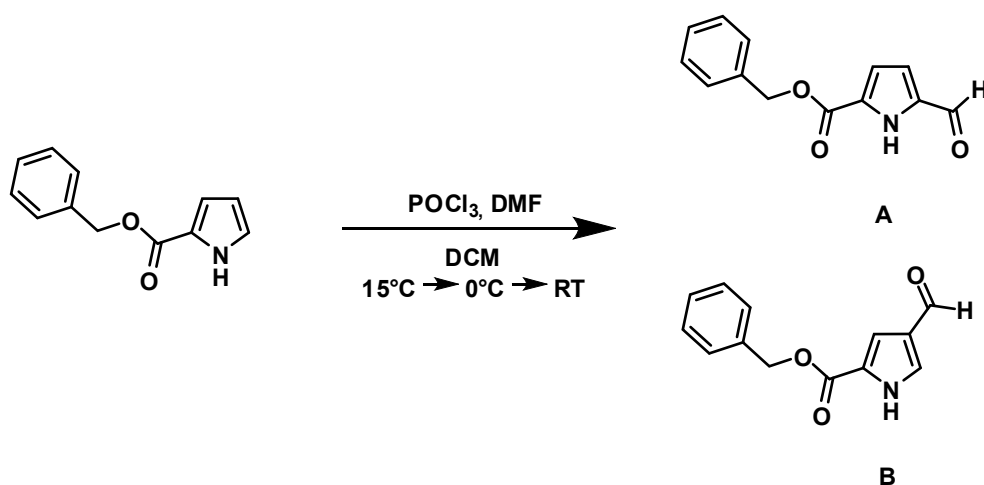
**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 5.32 (s, 2 H, H-7), 6.26-6.28 (m, 1 H, H-3), 6.94-6.97 (m, 1 H, H-2), 6.98-6.99 (m, 1 H, H-4), 7.32-7.44 (m, 5 H, H-9, H-10, H-11), 9.19 (brs, 1 H, H-1).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 66.1 (C-7), 110.7 (C-3), 115.8 (C-4), 122.8 (C-5), 123.1 (C-2), 128.3, 128.4, 128.7 (C-9, C-10, C-11), 136.3 (C-8), 161.0 (C-6).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>: *m/z* 200.0731, gef.: 200.0763.



### 5.2.7 Formylpyrrol-2-carbonsäurebenzylester



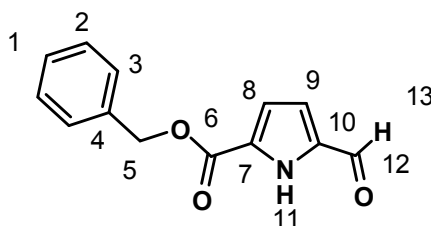
#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
1H-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester	201.22	1	60	12.1	
Phosphorylchlorid	153.33	2	120	18.4	11.0
Dimethylformamid					23
Dichlormethan					250

#### Durchführung:

Zur Erzeugung des Vilsmeier-Reagenz wurden 11.0 mL Phosphorylchlorid (18.4 g, 120 mmol) wurde bei 5 – 10°C langsam in abs. DMF getropft und für 30 min gerührt. 12.1 g 1H-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (60 mmol) wurden in 250 mL DCM gelöst und auf -15°C gekühlt. Das Vilsmeier-Reagenz wurde innerhalb von 15 min. hinzugegetropft. Die Reaktionslösung wurde bei 0°C für 3h und anschließend für weitere 24h bei Raumtemperatur gerührt. Eine gesättigte wässrige Natriumcarbonat-Lösung (150 mL) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 15 min. unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration der Reaktionslösung wurde die organische Phase abgetrennt mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen (2 x 50 mL) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde zuerst unter vermindertem

Druck und anschließend im Hochvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Diethylether versetzt und bei Raumtemperatur gerührt, bis sich eine feine Suspension gebildet hat. Der gebildete weiße Feststoff (Hauptprodukt) wurde filtriert und mit Diethylether gewaschen. Das hellgelbe Nebenprodukt verbleibt in Lösung und kann ausgewaschen werden. Es wurden 7.161 g Formylpyrrol-2-carbonsäurebenzylester (31.2 mmol, 52%) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 7.161 g, 52%

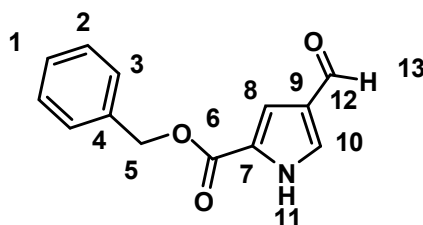
**Schmelzpunkt:** 105°C

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.55 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70 : 15 : 15)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 5.35 (s, 2 H, H-5), 6.93-6.98 (m, 2 H, H-8, H-9), 7.36-7.44 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 9.66 (s, 1 H, H-13), 9.84 (brs, 1 H, H-11).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 67.2 (C-5), 116.1 (C-8), 119.9 (C-9), 128.3 (C-7), 128.6, 128.7, 128.8 (C-1, C-2, C-3), 134.73 (C-10), 135.4 (C-4), 160.3 (C-6), 180.5 (C-12).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>: m/z 228.0741, gef.: 228.0739.



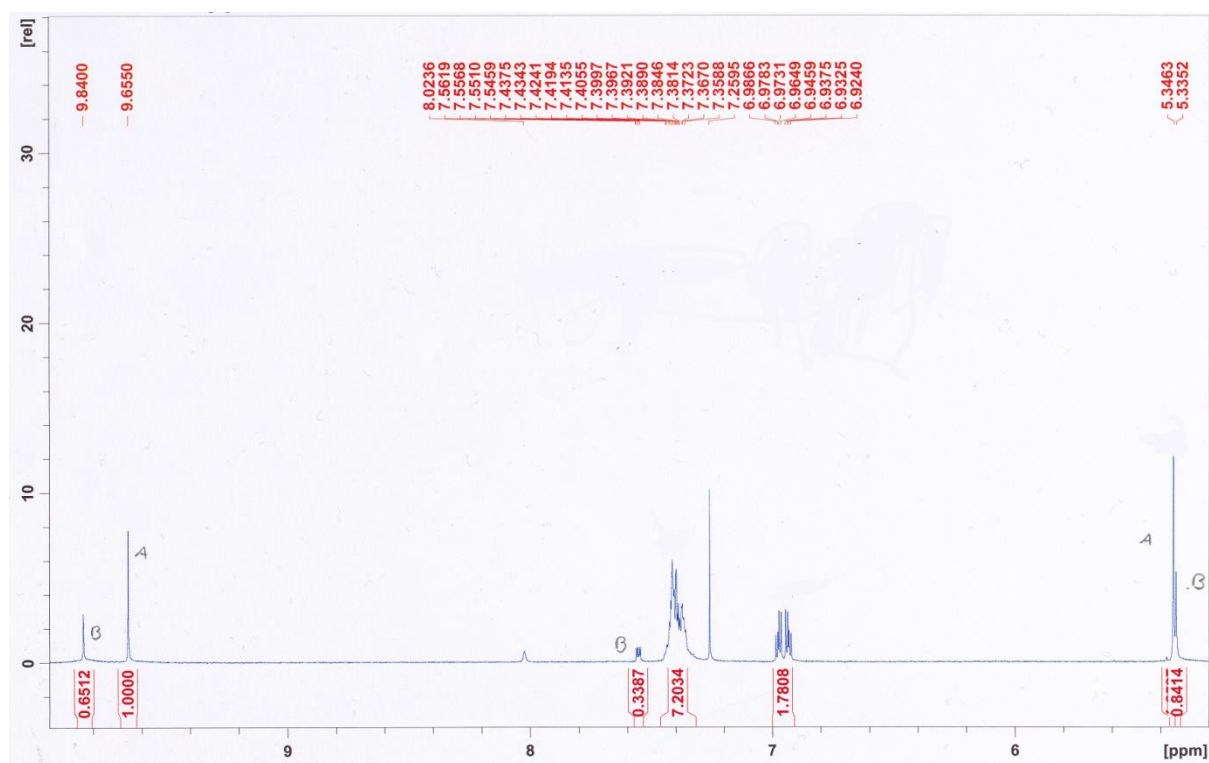
**Schmelzpunkt:** 99°C

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.13 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat/Dichlormethan = 70 : 15 : 15)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 5.35 (s, 2 H, H-5), 6.93-6.98 (m, 2 H, H-8, H-10), 7.36-7.44 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 9.80 (s, 1 H, H-13), 10.20 (brs, 1 H, H-11).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 66.7 (C-5), 116.1 (C-8), 119.9 (C-10), 128.3 (C-7), 128.2, 128.5, 128.6 (C-1, C-2, C-3), 128.7 (C-9), 135.4 (C-4), 160.7 (C-6), 185.7 (C-12).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>: m/z 228.0741, gef.: 228.0739.



**Abb. 5.2:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) von Formylpyrrol-2-carbonsäurebenzylester (Haupt- und Nebenprodukt).

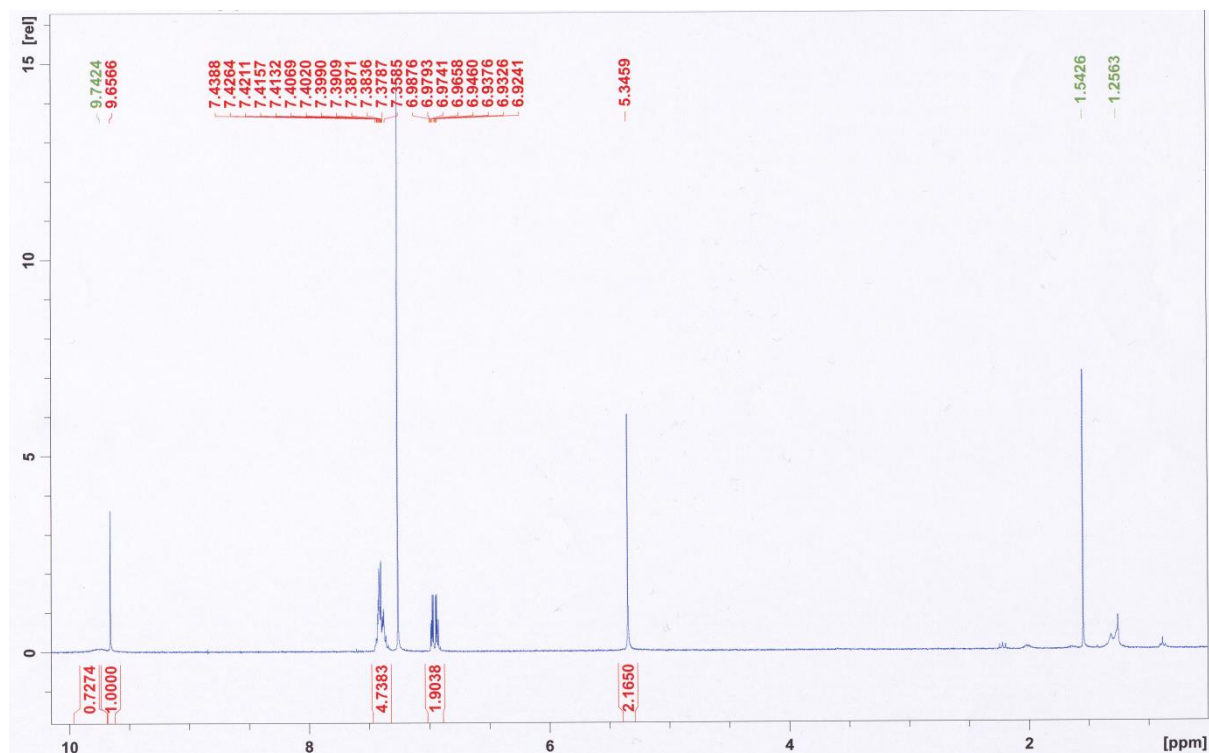
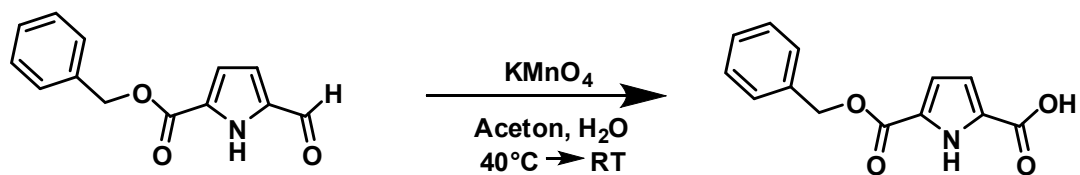


Abb. 5.3: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) von Formylpyrrol-2-carbonsäurebenzylester (Hauptprodukt).

### 5.2.8 1H-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester

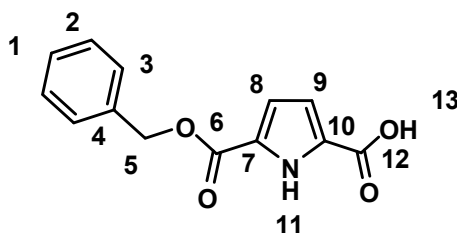


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Formylpyrrol-2-carbonsäurebenzylester	229.23	1.0	17.58	4.03	
Kaliumpermanganat	158.03	2.0	35.17	5.56	
Aceton					85
dest. Wasser					35

**Durchführung:**

4.03 g Formylpyrrol-2-carbonsäurebenzylester (17.58 mmol) wurden in 85 mL Aceton gelöst und mit 35 mL Wasser versetzt. Unter Rühren wurde portionsweise innerhalb von einer Stunde 5.56 g Kaliumpermanganat (35.17 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird nach beendeter Zugabe für 1h bei 40°C und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. 300 mg Natriumdithionit wurden zugegeben und für ca. 10 gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und mit 40 mL einer 5 %igen wässrigen Natronlauge gewaschen. Das Filtrat wurde mit gekühlter 2 M HCl angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit 2 M HCl gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Es wurden 2.99 g 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester (12.2 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 2.99 g, 69%

**Schmelzpunkt:** 234°C

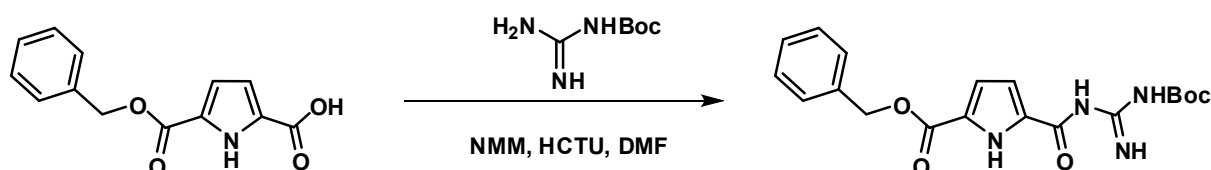
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.59 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Dichlormethan/Triethylamin = 5 : 5 : 1 %)

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 5.29 (s, 2 H, H-5), 6.75-6.77 (m, 1 H, H-9), 6.83-6.85 (m, 1H, H-8), 7.32-7.47 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 12.54 (s, 1 H, H-11), 12.83 (brs, 1 H, H-13).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 65.5 (C-5), 115.1 (C-9), 115.6 (C-8), 125.9 (C-10), 127.9 (C-7), 128.0, 128.1, 128.4 (C-1, C-2, C-3), 136.2 (C-4), 159.6 (C-6), 161.2 (C-12).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_4^-$ :  $m/z$  244.0687, gef.: 244.0688.

### 5.2.9 1H-Pyrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester



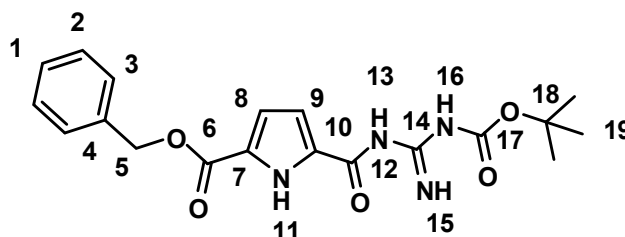
#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
1H-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester	245.23	1.0	4.07	1.00	
Boc-Guanidin	159.19	2.0	8.14	1.30	
NMM	101.15	2.2	9.09		1
HCTU	413.69	1.1	4.48	1.85	
DMF					20

#### Durchführung:

1.00 g 1H-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester (4.07 mmol) wurden in 20 mL DMF gelöst und mit 1.85 g HCTU (4.48 mmol) und 1 mL NMM versetzt. Die

Reaktionslösung wurde entgast und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. 1.30 g Boc-Guanidin wurden hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam unter Rühren in 60 mL dest. Wasser getropft und mit Hilfe eines Eisbades gekühlt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem dest. Wasser gewaschen. Es wurden 1.54 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester (3.98 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 1.54 g, 98%

**Schmelzpunkt:** 88°C

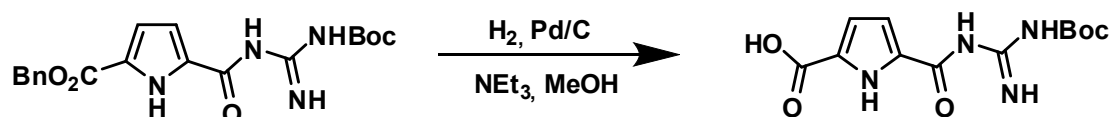
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.51 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Ethylacetat/Triethylamin = 3 : 2 : 1%)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.46 (s, 9H, H-19), 5.31 (s, 2 H, H-5), 6.85 (m, 2 H, H-8, H-9), 7.30-7.46 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 8.58 (brs, 1 H, NH), 9.31 (brs, 1 H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 27.7 (C-19), 65.5 (C-5), 81.2 (C-18), 115.1 (C-9), 115.6 (C-8), 124.52 (C-10), 127.9 (C-7), 128.0, 128.1, 128.4 (C-1, C-2, C-3), 133.97 (C-14), 136.2 (C-4), 158.3 (C-12), 159.77 (C-6), 168.04 (C-17).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Na: m/z 409.146, gef.: 409.149.

#### 5.2.10 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure

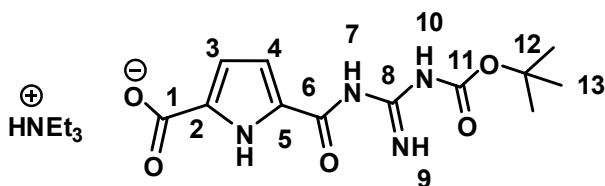


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
1 <i>H</i> -Pyrrol-5- <i>N</i> -Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester	386.4	1.0	3.98	1.54	
Triethylamin	101.2	1.5	6.00	0.61	0.835
Pd/C				0.15	
Methanol					20

**Durchführung:**

1.54 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester (3.98 mmol) wurden in Methanol suspendiert und mit katalytischen Mengen Pd/C versetzt. Unter starkem Rühren und H<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde die Reaktionsmischung bis zum vollständigen Umsatz auf 40°C erhitzt (TLC-Kontrolle). Die Suspension wurde anschließend über Celite filtriert und mit Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde verworfen und der Filterkuchen mit einer Mischung aus Methanol und 835 µL Triethylamin gewaschen. Schließlich wurde das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff lyophilisiert. Es wurden 1.33 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure (3.34 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 1.33 g, 84%

**Schmelzpunkt:** > 300°C

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.64 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol/Triethylamin = 8 : 2 : 1%)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.08 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 7.20, 9H, NEt<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 9H, H-13), 2.79 (q, 6 H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7.20, NEt<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 6.47 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 3.64, 1 H, H-

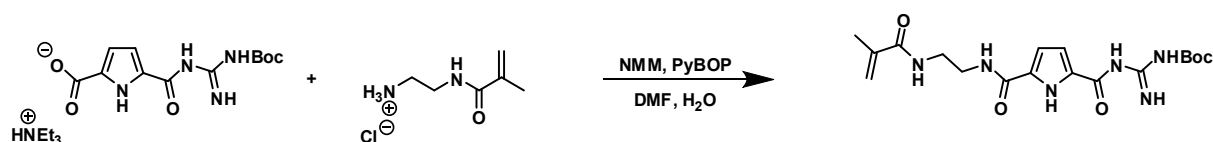


3), 6.77 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 3.68$ , 1 H, H-4), 8.58 (brs, 1 H, NH), 9.31 (brs, 1 H, NH), 10.84 (brs, 1H, NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 9.7 ( $\text{NEt}_3\text{-CH}_3$ ), 27.7 (C-13), 45.2 ( $\text{NEt}_3\text{-CH}_2$ ), 80.2 (C-12), 112.1 (C-3), 114.1 (C-4), 128.8 (C-6), 133.0 (C-2), 158.5 (C-8), 160.6 (C-6), 163.9 (C-1), 167.2 (C-11).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5^-$  : m/z 295.105, gef.: 295.105.

### 5.2.11 1H-Pyrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)ethyl]amid

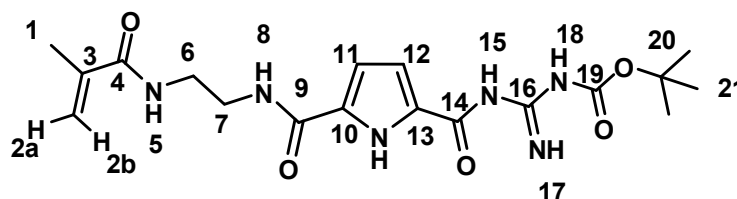


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
1H-Pyrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure	397.47	1.0	3.34	1.33	
N-(2-aminorthyl)methacrylamid Hydrochlorid	164.63	2.0	6.68	1.01	
HCTU	413.69	1.1	3.67	1.52	
NMM	101.15	3.0	10.02	1.01	1.1
DMF/H <sub>2</sub> O (4 : 1)					132.5

**Durchführung:**

1.33 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure (3.34 mmol) wurden in 132.5 mL DMF/H<sub>2</sub>O gelöst und mit 1.52 g HCTU (3.67 mmol) und 1.1 mL NMM (10.02 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde entgast und unter Argonatmosphäre für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. 1.01 g *N*-(2-aminorthyl)methacrylamid Hydrochlorid (6.68 mmol) wurden in 7.3 mL Wasser gelöst und zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt (TLC-Kontrolle), anschließend mit 400 mL Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert (5 x 65 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Methanol 3 : 1). Das erhaltene gereinigte Produkt wurde erneut säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat). Es wurden 0.603 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)ethyl]amid (1.48 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Schmelzpunkt:** 23°C

**Ausbeute:** 0.603 g, 44%

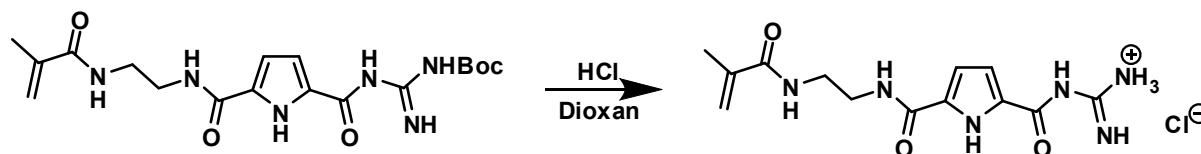
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.15 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.43 (s, 9 H, H-21), 1.92 (s, 3 H, H-1), 3.53 (m, 4 H, H-6, H-7), 5.31 (s, 1 H, H-2a), 5.74 (s, 1 H, H-2b), 6.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.9 Hz, H-11/12), 6.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.9 Hz, H-11/12), 7.09 (m, 1 H, NH), 7.67 (m, 1 H, NH), 8.53 (brs, 1 H, NH), 9.07 (brs, 1 H, NH), 10.5 (brs, 1 H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1), 27.8 (C-21), 38.3 (C-7), 38.9 (C-6), 111.7 (C-11, C-12), 119.2 (C-2), 139.9 (C-3), 159.9 (C-9), 167.6 (C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> : m/z 405.1866, gef.: 405.1859.

### 5.2.12 1H-Pyrrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methyl-acryloylamino)ethyl]amid Hydrochlorid

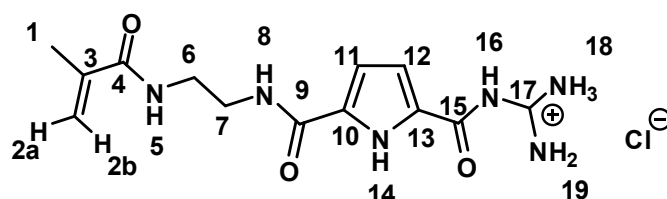


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
1H-Pyrrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)ethyl]amid	406.44	1	0.83	0.266	
konz. HCl					9.5
Dioxan					28.4

#### Durchführung:

266 mg 1H-Pyrrrol-5-N-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)ethyl]amid (0.83 mmol) wurden in 28.4 mL Dioxan gelöst und mit 9.5 mL konz. HCl versetzt. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene Feststoff gefriergetrocknet. Es wurden 228 mg 1H-Pyrrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methylacryloylamino)ethyl]amid (0.665 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Schmelzpunkt:** > 300°C

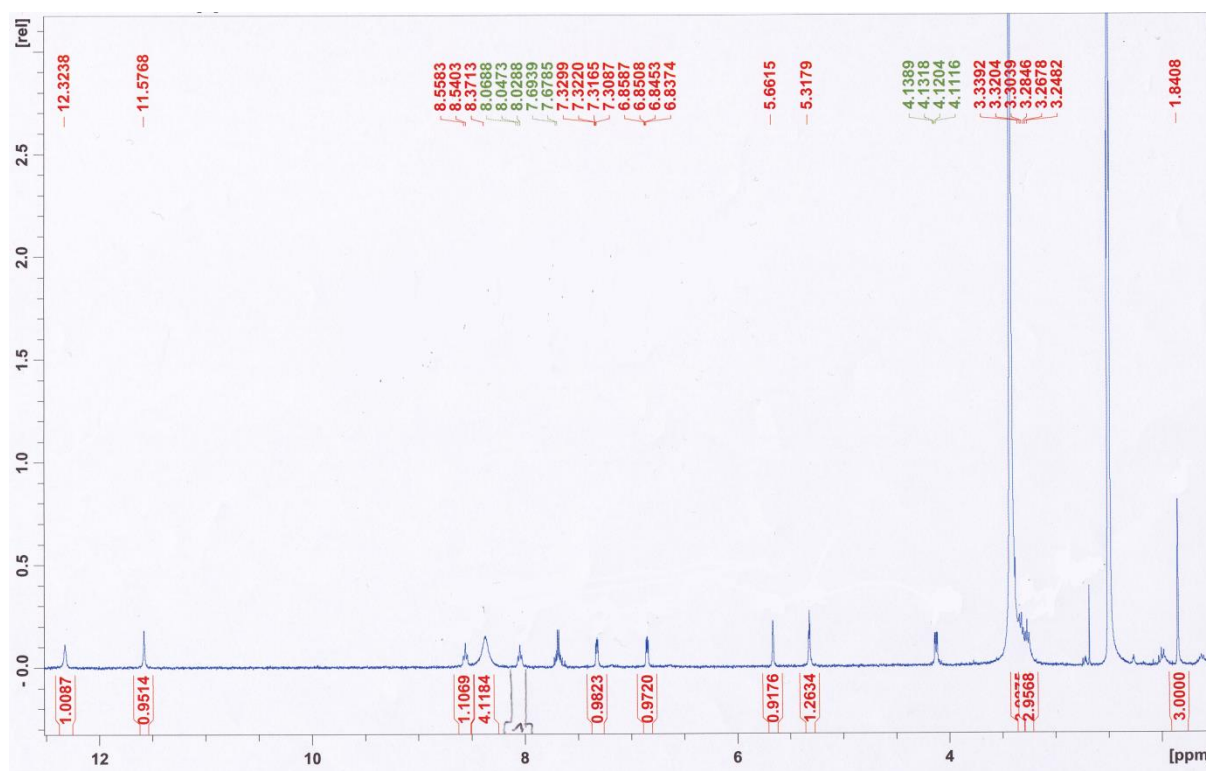
**Ausbeute:** 0.228 g, 80%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.15 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat)

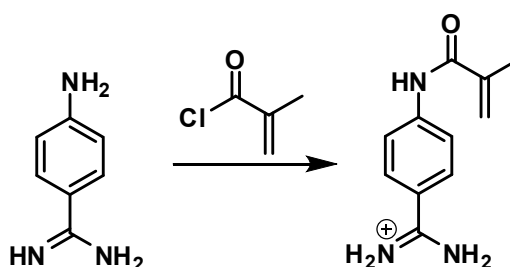
**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.84 (s, 3 H, H-1), 3.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 2 H, H-6), 3.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 2 H, H-7), 5.32 (s, 1 H, H-2a), 5.66 (s, 1 H, H-2b), 6.84 (m, 1 H, H-11/12), 7.40 (m, 1 H, H-11/12), 8.08 (m, 1 H, H-5), 8.44 (m, 4 H, H-18, H-19), 8.59 (m, 1 H, H-8), 11.78 (m, 1 H, H-16), 12.34 (m, 1 H, H-14).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1), 38.5 (C-7), 38.7 (C-6), 112.4 (C-11), 115.9 (C-12), 119.2 (C-2), 125.4 (C-10), 132.9 (C-13), 139.8 (C-3), 155.4 (C-17), 159.3 (C-9), 159.6 (C-15), 167.7 (C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> : m/z 307.1598, gef.: 307.1573.



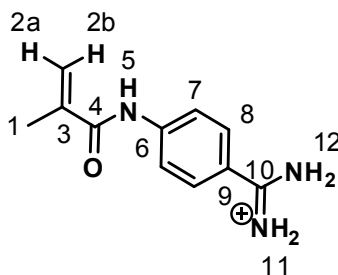
**Abb. 5.4:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 1*H*-Pyrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carboxäure-[2-(2-methyl-acryloylamino)ethyl]amid.

**5.2.13. N-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat <sup>[90]</sup>****Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
4-Aminobenzamidin-dihydrochlorid	135.17	1	2.40	0.5	
Methacrylsäurechlorid	104.53	3.6	8.63		1
Natriumacetat-Lösung (17 %ig)					50

**Durchführung:**

500 mg 4-Aminobenzamidin-dihydrochlorid (2.40 mmol) wurden in 17%iger wässriger Natriumacetat-Lösung (50 mL) gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt. Unter Rühren wurden 1 mL Methacrylsäurechlorid (8.63 mmol) hinzugegeben. Die viskose Reaktionslösung wurde 45 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 2 M Salpetersäure auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert in warmem dest. Wasser aufgenommen und mit wenigen Tropfen 2 M Salpetersäure ausgefällt. Die Suspension wurde erneut filtriert, mit kaltem dest. Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 292 mg N-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat (1.42 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

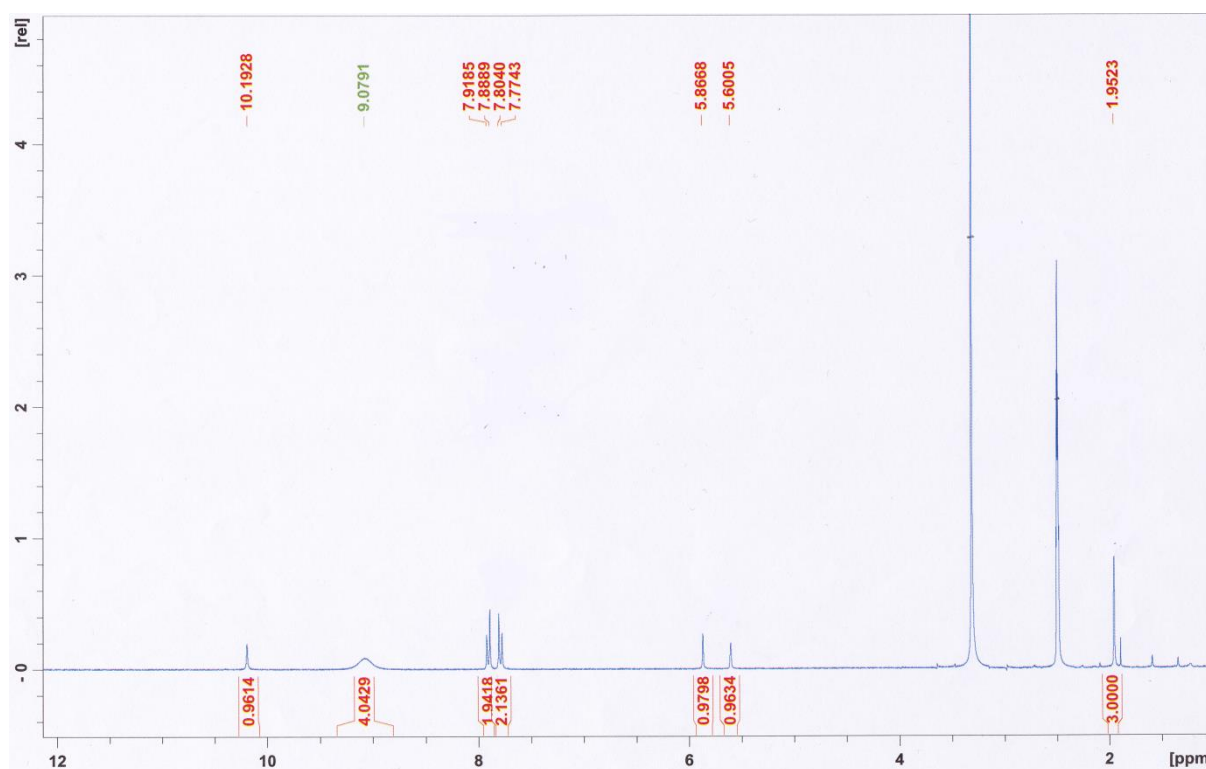


**Ausbeute:** 0.292 g, 51%

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.95 (s, 3H, H-1), 5.60 (s, 1H, H-2a), 5.87 (s, 2H, H-2b), 7.79 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.91$  Hz, 2H, H-8), 7.90 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.88$  Hz, 2H, H-7), 9.08 (brs, 4H, H-11, H-12), 10.19 (brs, 1H, H-5).

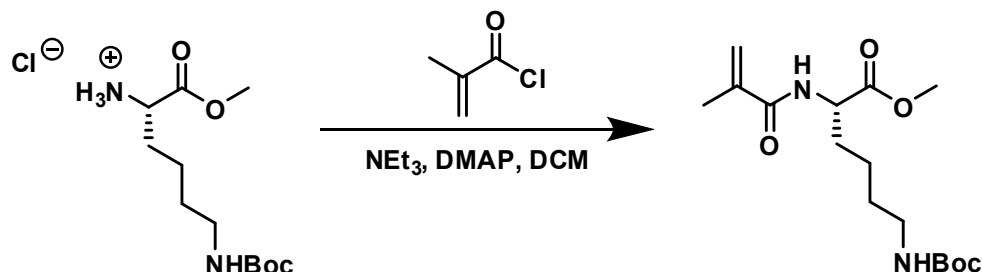
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 18.6 (C-1), 119.5 (C-7), 121.0 (C-2), 122.0 (C-9), 129.0 (C-8), 139.9 (C-6), 144.1 (C-3), 164.7, 167.3 (C-2, C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}$  :  $m/z$  204.1131, gef.: 204.1163.



**Abb. 5.5:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) von N-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat.

### 5.2.14 6-tert-Butoxyxarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure- methylester

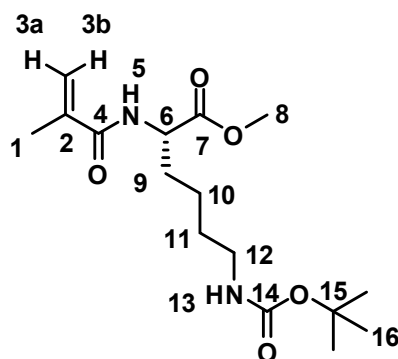


#### Ansatz:

Edukte		M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
H-Lys(Boc)-OMe	*	296.79	1.0	1.68	0.5	
HCl						
Methacrylsäurechlorid		104.53	1.1	1.85		0.182
Triethylamin		101.19	3.0	5.04		0.703
DMAP		122.17	kat.			
Dichlormethan						30

#### Durchführung:

500 mg H-Lys(Boc)-OMe Hydrochlorid (1.68 mmol) wurden in 30 mL Dichlormethan gelöst, mit 703 µL Triethylamin (5.04 mmol) und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt und für 30 min gerührt. Eine Lösung von 182 µL Methacrylsäurechlorid in 20 mL Dichlormethan wurden unter Rühren bei 0°C langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und bis zur vollständigen Umsetzung (TLC-Kontrolle) gerührt. Das Rohprodukt wurde mit 150 mL einer wässrigen 0.6 M NaOH-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das verbliebene Öl säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 1 : 1). Es wurden 165 mg 6-tert-Butoxyxarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure-methylester (0.5 mmol) als farbloses Öl erhalten.



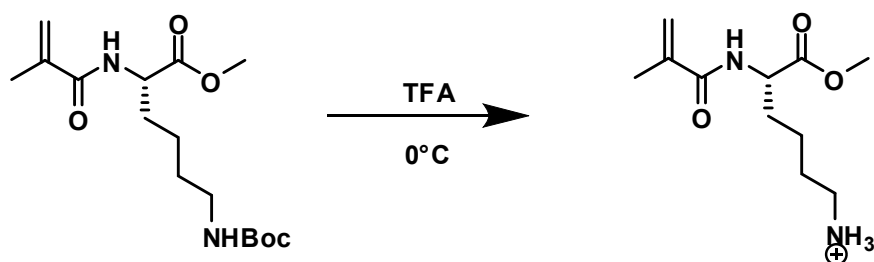
**Ausbeute:** 165 mg, 30%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.38 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Dichlormethan 1 : 1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.34 (m, 2 H, H-10), 1.42 (s, 9 H, H-16), 1.49 (m, 2 H, H-11), 1.70 (m, 1 H, H-9), 1.89 (m, 1 H, H-9), 1.97 (s, 3 H, H-1), 3.10 (t,  $^3J_{H,H}$  = Hz, 2 H, H-12), 3.75 (s, 3 H, H-8), 4.59 (sb, 1 H, H-13), 4.65 (t,  $^3J_{H,H}$  = 5.2 Hz, 1 H, H-6), 5.37 (s, 1 H, H-3a), 5.75 (s, 1 H, H-3b), 6.36 (d,  $^3J_{H,H}$  = 7.6 Hz 1 H, H-4).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 18.6 (C-1), 22.2 (C-10), 28.5 (C-16), 29.5 (C-11), 32.4 (C-9), 52.1 (C-8), 52.6 (C-6), 120.2 (C-3), 139.4 (C-2), 156.2 (C-14), 168.2 (C-4), 173.2 (C-7).

### 5.2.15 6-Amino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäuremethylester



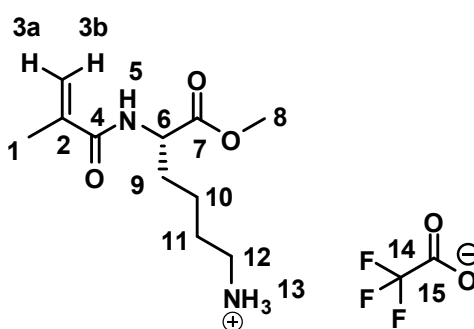


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
6-tert-Butoxyxarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure-methylester	328.4	1	0.5	0.165	
Trifluoressigsäure					5
Dichlormethan					10

**Durchführung:**

165 mg 6-tert-Butoxyxarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure-methylester (0.5 mmol) wurden unter Schutzgas in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt. 5 mL Trifluoressigsäure wurden unter Rühren zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene Lösung mit kaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende farblose Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 168 mg 6-tert-Butoxyxarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure-methylester (0.49 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



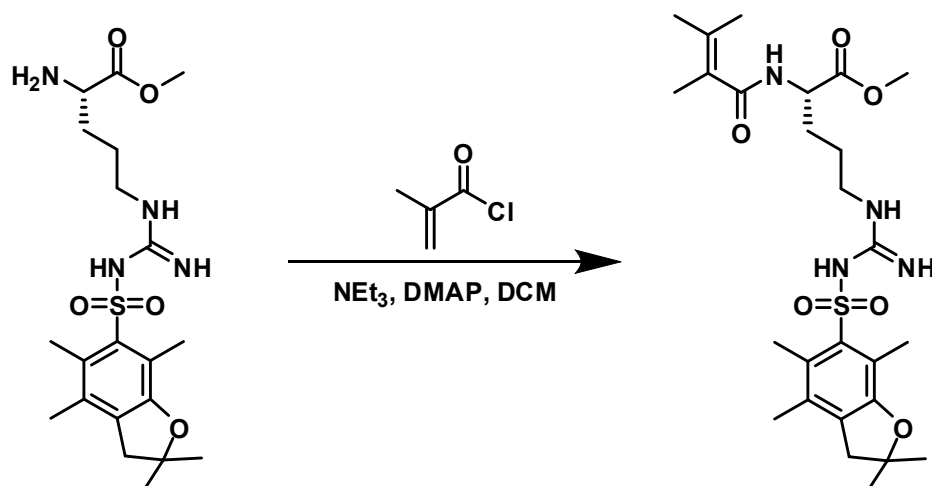
**Ausbeute:** 0.168 g, 98%

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.47 (m, 2 H, H-10), 1.70 (m, 2 H, H-11), 1.86 (m, 1 H, H-9), 1.94 (s, 3 H, H-1), 1.99 (m, 1 H, H-9), 3.00 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2 H, H-12), 3.75 (s, 3 H, H-8), 4.43 (m, 1 H, H-6), 5.51 (s, 1 H, H-3a), 5.73 (s, 1 H, H-3b).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 17.7 (C-1), 22.3 (C-10), 26.3 (C-11), 29.9 (C-9), 39.3 (C-12), 52.8 (C-6), 117.45 (C-14), 121.3 (C-3), 138.6 (C-2), 156.2 (C-14), 158.5 (C-15), 172.3 (C-4), 175.7 (C-7).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$  :  $m/z$  229.1544, gef.: 229.1573.

**5.2.16 (S)-methyl-2-methacrylamido-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)sulfonyl)guanidino)pentanoat**

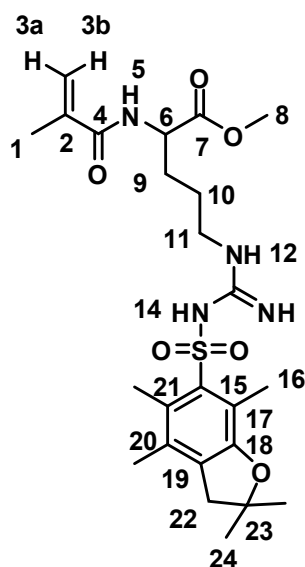


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
H-Arg(Pbf)-OMe	477.018	1	0.22	0.105	
Methacrylsäurechlorid	181.83	2	0.44		0.043
Triethylamin	101.19	4	0.88		0.122
DMAP	122.17	kat.			
		Menge			
Dichlormethan					20

**Durchführung:**

105 mg H-Arg(Pbf)-OMe (0.22 mmol) wurden in 10 mL Dichlormethan suspendiert und mit 122  $\mu$ L Triethylamin und katalytischen Mengen DMAP versetzt und mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus Methacrylsäurechlorid in Dichlormethan langsam innerhalb von 3h hinzuge tropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 12h gerührt. Nach beendeter Reaktion (TLC-Kontrolle) wurde die Reaktionslösung mit 30 mL einer 0.6 M wässrigen NaOH-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Ethylacetat) gereinigt. Es wurden 91 mg (S)-methyl-2-methacrylamido-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-6-ylsulfonyl)guanidino)pentanoat (0.17 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



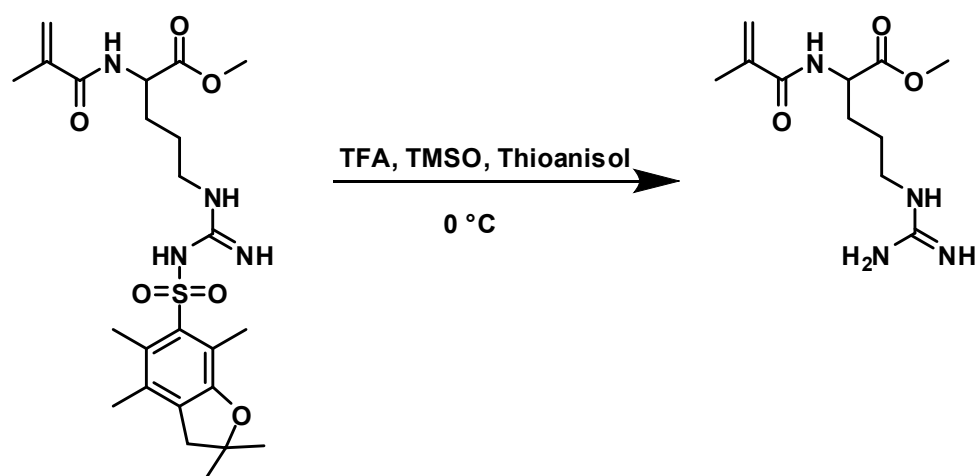
**Ausbeute:** 0.91 g, 77%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.39 ( $\text{SiO}_2$ , Ethylacetat)

**<sup>1</sup>H-NMR** ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.48 (s, 6 H, H-24), 1.55 (m, 2 H, H-10), 1.90 (m, 2 H, H-9), 1.93 (s, 3 H, H-1), 2.34 (s, 9 H, H-16), 2.66 (m, 2 H, H-11), 2.87 (s, 2 H, H-22), 3.67 (s, 3 H, H-8), 4.45 (m, 1 H, H-6), 5.47 (s, 1 H, H-2a), 5.85 (s, 1 H, H-2b), 7.81 (brs, 1 H, NH), 8.10 (brs, 1 H, NH).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$  : m/z 536.2669, gef.: 536.2685.

## 5.2.17 Methyl-5-guanidino-2-methacrylamidopentanoat

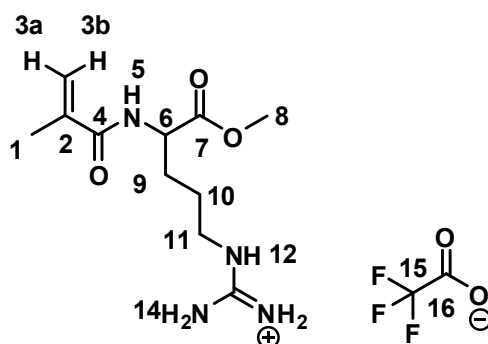
**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
(S)-methyl-2-methacrylamido-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-6-ylsulfonyl)guanidino)pentanoat	536.68	1.0	0.17	0.91	
Trifluoressigsäure					5.00
TMSO	222.26	4.5	0.77	0.17	0.14
Thioanisol	124.20	6.0	1.02	0.13	0.12
Dichlormethan					10.00

**Durchführung:**

91 mg (S)-methyl-2-methacrylamido-5-(3-(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-6-ylsulfonyl)guanidino)pentanoat (0.17 mmol) wurden unter Schutzgas in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt. 5 mL Trifluoressigsäure, 140 µL TMSO (0.77 mmol) und 120 µL Thioanisol (1.02 mmol) wurden unter Rühren zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter

vermindertem Druck entfernt und die verbliebene Lösung mit kaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende farblose Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 67.7 mg 6-*tert*-Butoxyxarbonylamino-2-(2methylacryloylamino)hexansäure-methylester (0.16 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

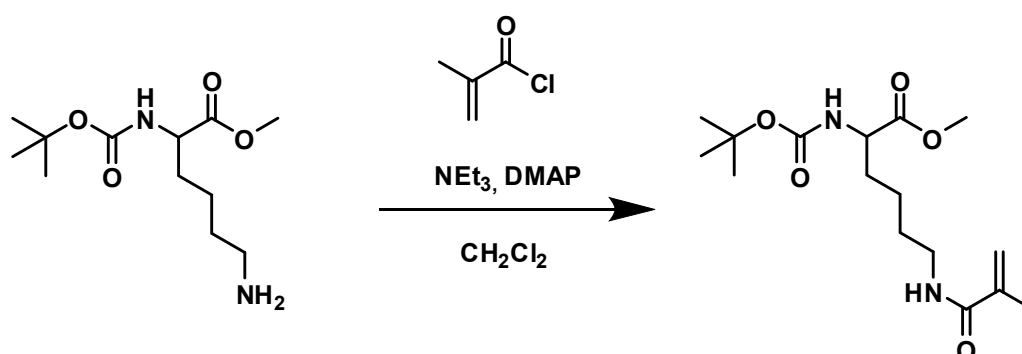


**Ausbeute:** 0.677 g, 94%

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.55 (m, 2 H, H-10), 1.90 (m, 2 H, H-9), 1.93 (s, 3 H, H-1), 2.66 (m, 2 H, H-11), 1.99 (m, 1 H, H-9), 3.67 (s, 3 H, H-8), 4.42 (m, 1 H, H-6), 5.49 (s, 1 H, H-3a), 5.89 (s, 1 H, H-3b), 6.63 (brs, 2 H, H-14), 7.83 (brs, 1 H, NH), 9.10 (brs, 1 H, NH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 18.5 (C-1), 24.3 (C-10), 26.3 (C-9), 39.9 (C-11), 51.3 (C-8), 52.8 (C-6), 117.45 (C-15), 124.3 (C-3), 141.6 (C-2), 158.2 (C-14), 181.5 (C-16), 168.3 (C-4), 171.7 (C-7).

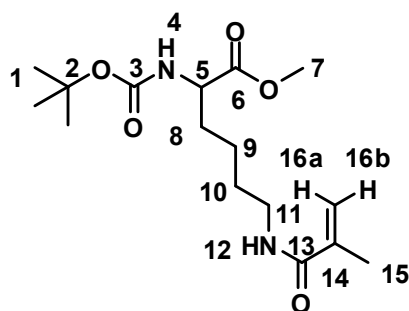
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5$  :  $m/z$  398.3780, gef.: 398.3776.

**5.2.18 Methyl-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexanoat****Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Boc-Lys-OMe * HCl	296.79	1.0	0.405	0.13	
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.1	0.446		0.044
Triethylamin	101.19	3.0	1.215		0.169
DMAP	122.17	kat.			
Mengen					
Dichlormethan					18.0

**Durchführung:**

130 mg Boc-Lys-OMe Hydrochlorid (0.405 mmol) wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst, mit 169 µL Triethylamin (1.215 mmol) und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt und für 30 min gerührt. Eine Lösung von 44 µL Methacrylsäure in 8 mL Dichlormethan wurden unter Rühren bei 0°C langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und bis zur vollständigen Umsetzung (TLC-Kontrolle) gerührt. Das Rohprodukt wurde mit einer wässrigen 0.6 M NaOH-Lösung gewaschen (5 x 15 mL) und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das verbliebene Öl säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan; 1 : 1). Es wurden 84.5 mg Methyl-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexanoat (0.257 mmol) als farbloses Öl erhalten.



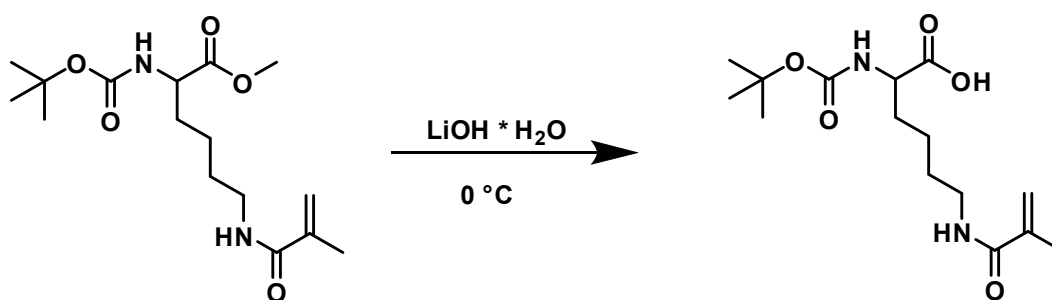
**Ausbeute:** 84.5 mg, 63%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.49 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.29 (m, 2 H, H-9), 1.42 (s, 9 H, H-1), 1.75 (m, 2 H, H-10), 1.77 (m, 2 H, H-8), 1.97 (s, 3 H, H-15), 3.23 (m, 2 H, H-11), 3.67 (s, 3 H, H-7), 4.27 (m, 1 H, H-5), 5.05 (s, 1 H, H-16a), 5.59 (s, 1 H, H-16b), 6.49 (brs, 1 H, NH), 8.21 (brs, 1 H, NH).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S : m/z 328.4039, gef.: 328.4032.

### 5.2.19 2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexansäure

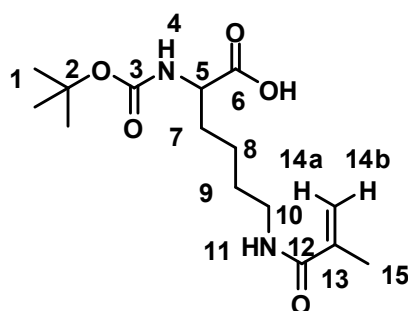


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
Methyl-2-( <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexanoat	328.404	1	0.131	43.0	
LiOH * H <sub>2</sub> O	41.964	2	0.262	10.7	
THF					4.0
H <sub>2</sub> O					1.5

**Durchführung:**

43 mg Methyl-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexanoat (0.131 mmol) wurden unter Rühren in THF/H<sub>2</sub>O gelöst und mit LiOH \* H<sub>2</sub>O versetzt. Die Reaktionslösung wurde ca. 30h bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der verbliebene Feststoff mit wenig dest. Wasser aufgenommen und mit 1 N HCl angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit 1 N HCl gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 40.4 mg 2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexansäure (0.126 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 404 mg, 96%

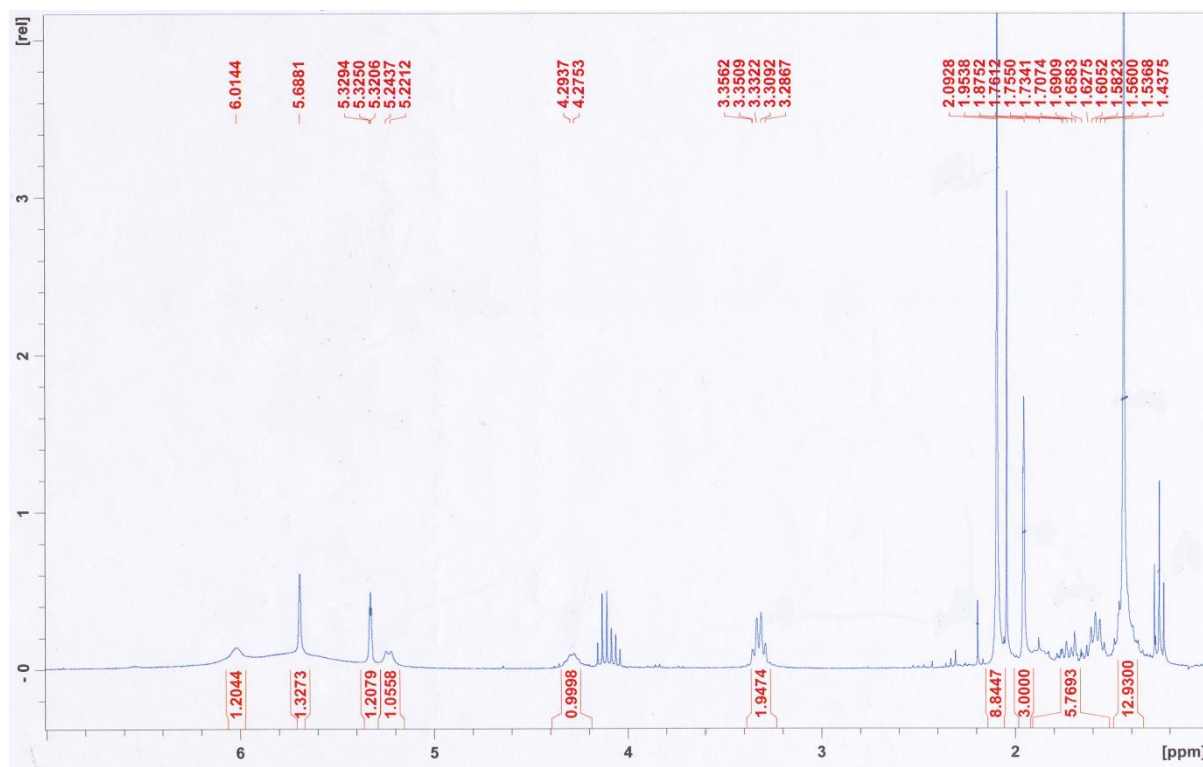
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.52 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.39 (s, 9 H, H-1), 1.43 – 1.87 (m, 6 H, H-7, H-8, H-9), 2.09 (s, 3 H, H-15), 3.33 (q, 2 H, H-10), 4.28 (m, 1 H, H-5), 5.23 (d, 1 H, H-4), 5.32 (s, 1 H, H-14a), 5.69 (s, 1 H, H-14b), 6.01 (brs, 1 H, OH).



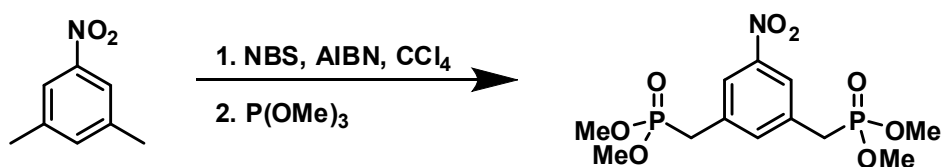
**$^{13}\text{C}$ -NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 18.5 (C-13), 21.0 (C-8), 28.4 (C-1), 29.7 (C-9), 30.5 (C-7), 40.6 (C-10), 50.45 (C-5), 79.5 (C-2), 124.0 (C-14), 141.3 (C-15), 155.9 (C-3), 168.9 (C-12), 174.7 (C-6).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$  :  $m/z$  342.2155, gef.: 342.2151.



**Abb. 5.6:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von 2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-6-methacrylamidohexansäure.

### 5.2.20 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol<sup>[91][92]</sup>



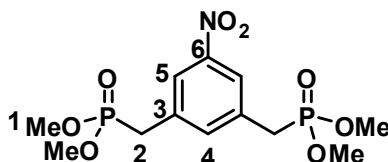
**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
5-Nitro- <i>m</i> -xylol	151.163	1.00	66	10.0	
<i>N</i> -Bromsuccinimid	56.883	2.10	138.6	24.7	
AIBN	151.722	0.02	1.22	0.2	
Trimethyl-phosphit	124.076	2.60	176.6	21.3	
Tetrachlormethan					200

**Durchführung:**

10.0 g 5-Nitro-*m*-xylol (66 mmol, 1.00 eq) wurden in 200 mL Tetrachlormethan gelöst und unter Rühren mit 24.7 g *N*-Bromsuccinimid (138.6 mmol, 2.10 eq) und 0.2 g AIBN (1.22 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zum Rückfluss erhitzt, bis das gesamte Succinimid an der Oberfläche schwamm. Dieses wurde abfiltriert und mit wenig Tetrachlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde getrocknet. Es verblieben 20.39 g des Rohproduktgemisches, welches ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

20.39 g 3,5-Bis(brommethyl)nitrobenzol (66 mmol, 1 eq) wurden in 20 mL Trimethylphosphit (21.3 g, 171.6 mmol, 2.60 eq) suspendiert und unter Rühren 5h unter Rückfluss erhitzt. Das überschüssige Trimethylphosphit wurde unter vermindertem Druck abkondensiert. Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan / Ethanol (19 : 1) säulenchromatographisch gereinigt. Es wurden 10.65 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol (29 mmol) als gelbliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 10.65 g, 44%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.25 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol 16 : 1)

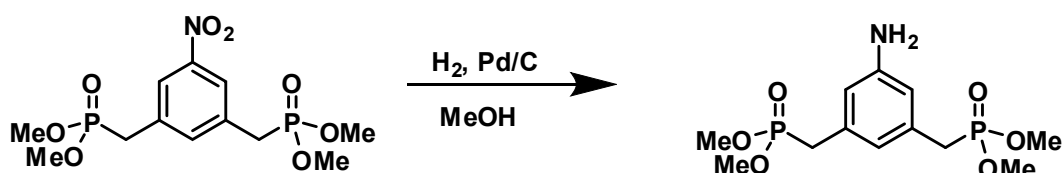
**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 3.24 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 22.1 Hz, 4 H, H-2), 3.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 10.9 Hz, 12 H, H-1), 7.59 (s, 1 H, H-4), 8.04 (m, 2 H, H-5).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 32.7 (C-2), 53.2 (C-1), 123.4 (C-4), 134.1 (C-5), 137.2 (C-3), 148.6 (C-6).

**$^{31}\text{P}$ -NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  [ppm] = 26.8.

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Na}$ :  $m/z$  390.0484, gef.: 390.0491.

### 5.2.21 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin

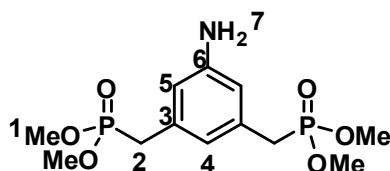


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol	367.229	1.0	13.3	5.0	
Pd/C		0.1			
Methanol					150

#### Durchführung:

5.0 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol (13.3 mmol, 1.0 eq) wurden in 150 mL Methanol gelöst, mit katalytischen Mengen Pd / C (10% Pd) versetzt und unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre 15h bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde über Kieselgur abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 4.64 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin (12.6 mmol) als farbloses Öl erhalten.



**Ausbeute:** 4.64 g, 95%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.12 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol 16 : 1)

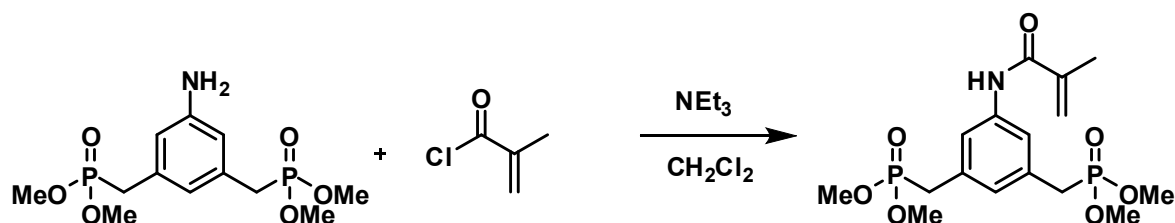
**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 3.04 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 21.8 Hz, 4 H, H-2), 3.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 10.7 Hz, 12 H, H-1), 6.54 (s, 2 H, H-5), 6.57 (s, 1 H, H-4).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ [ppm] = 32.2 – 33.3 (C-2), 53.0 (C-1), 115.3 (C-5), 121.5 (C-4), 132.6 (C-3), 146.9 (C-6).

**<sup>31</sup>P-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ [ppm] = 28.9.

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>P<sub>2</sub>Na: m/z 360.0742, gef.: 360.0762.

## 5.2.22 N-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid



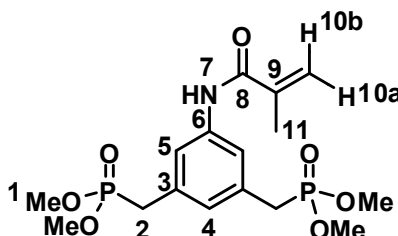
**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin	337.25	1.00	11.3	4.15	
DMAP	122.17	kat.			
Mengen					
Triethylamin	101.19	1.18	13.3	1.35	
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.51	17.1	1.79	
Dichlormethan					40

**Durchführung:**

4.15 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin (11.3 mmol, 1.00 eq) wurden in 30 mL Dichlormethan gelöst und mit 1.35 g Triethylamin (13.3 mmol, 1.18 eq) und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus 1.79 g Methacrylsäurechlorid (17.1 mmol, 1.51 eq) in 10 mL Dichlormethan langsam zugetropft. Anschließend wurde Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt, die organische Phase abgetrennt, mit 30 mL 0.6 M NaOH gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH 19 : 1). Es wurden 4.01 g *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid (9.9 mmol) als farbloses Öl.



**Ausbeute:** 4.01 g, 88%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.09 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol 16 : 1)

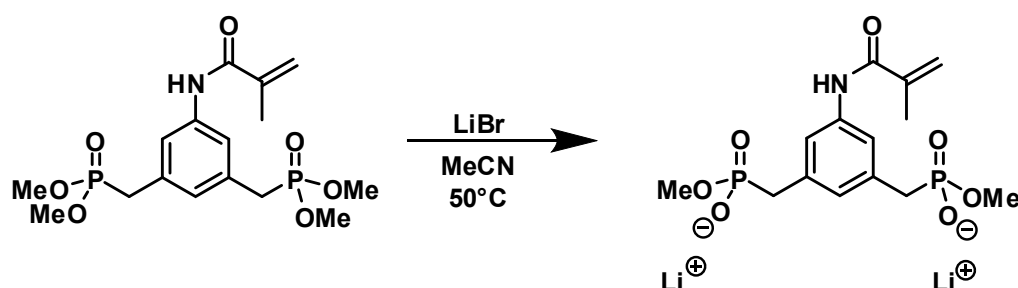
**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.04 (s, 3 H, H-11), 3.12 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 21.9$  Hz, 4 H, H-2), 3.67 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.8$  Hz, 12 H, H-1), 5.45 (s, 1 H, H-10a), 5.79 (s, 1 H, H-10b), 6.97 (brs, 1 H, H-7), 7.47 (s, 1 H, H-4), 7.73 (s, 2 H, H-5).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 18.8 (C-11), 32.7 (C-2), 53.1 (C-1), 120.1 (C-10, C-4), 127.1 (C-5), 132.6 (C-9), 138.6 (C-3), 140.8 (C-6), 166.8 (C-8).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  [ppm] = 28.3.

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_7\text{P}_2\text{Na}$ :  $m/z$  428.1004, gef.: 328.1031.

### 5.2.23 Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid

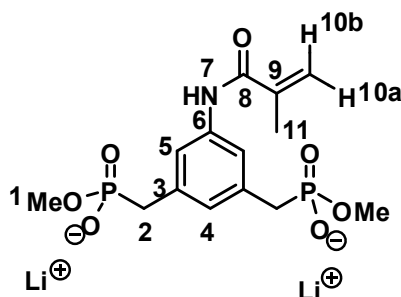


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
<i>N</i> -[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid	405.31	1.0	1.2	500	
LiBr	86.85	2.2	2.7	236	
Acetonitril					26

**Durchführung:**

500 mg *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid (1.2 mmol, 1.0 eq) wurden in 20 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 6 mL LiBr-Lösung (5% in Acetonitril, 236 mg, 2.73 mmol, 2.2 eq) versetzt und unter Ar-Atmosphäre bei 50°C 7 Tage gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert und die klare Lösung abdekantiert. Der abgeschiedene farblose Feststoff wurde viermal mit je 5 mL Acetonitril und einmal mit 5 mL Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 436 mg Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacryl-säureamid (1.12 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



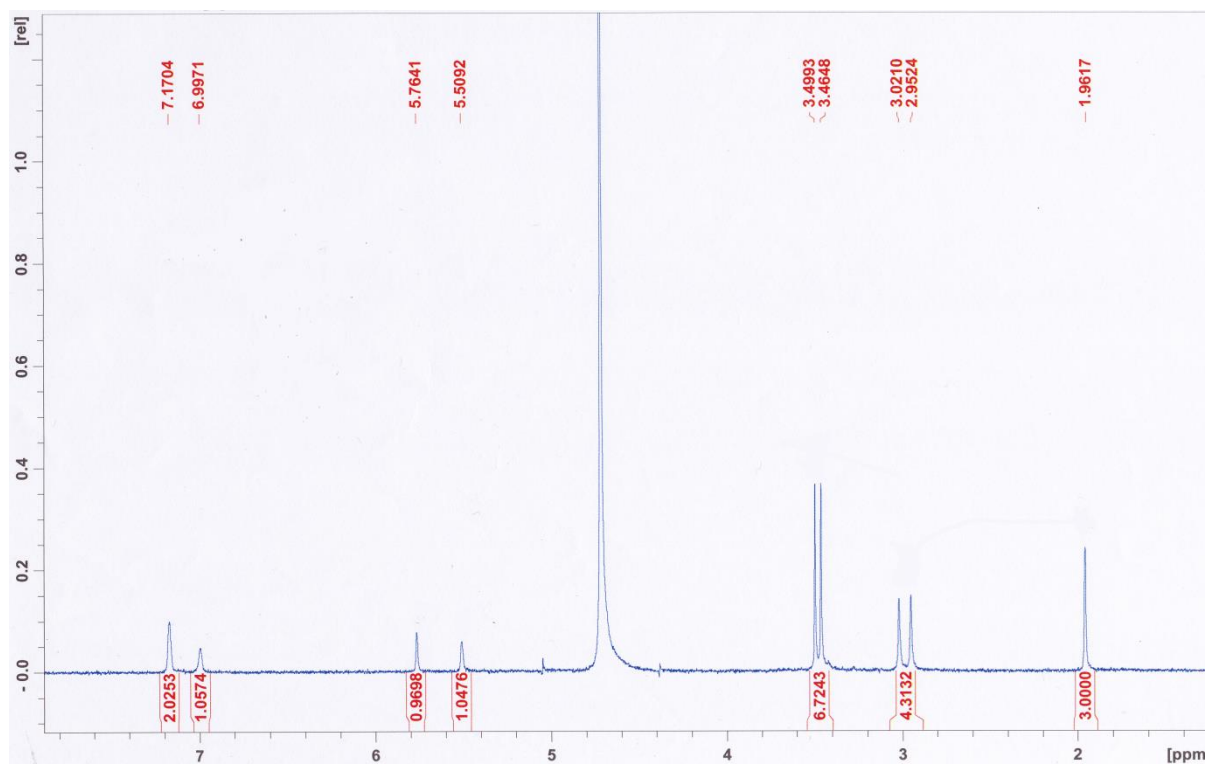
**Ausbeute:** 0.436 g, 93%

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ [ppm] = 1.96 (s, 3 H, H-11), 2.99 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 20.58 Hz, 4 H, H-2), 3.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 10.35 Hz, 12 H, H-1), 5.51 (s, 1 H, H-10a), 5.76 (s, 1 H, H-10b), 7.00 (s, 1 H, H-4), 7.17 (s, 2 H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): δ [ppm] = 17.8 (C-11), 33.9 (C-2), 51.9 (C-1), 121.5 (C-10), 121.6 (C-5), 128.2 (C-4), 135.8 (C-3), 136.7 (C-6), 139.9 (C-9), 171.1 (C-8).

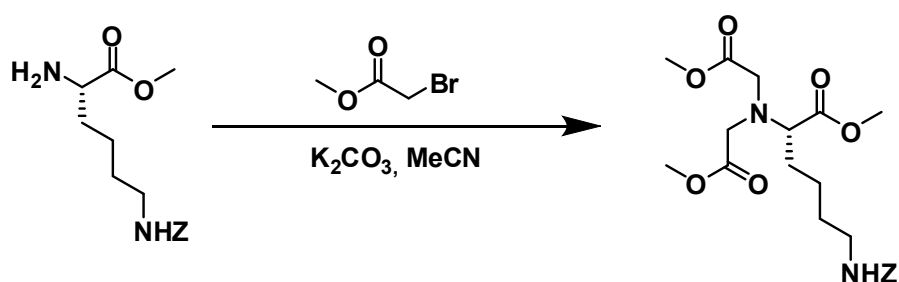
**<sup>31</sup>P-NMR** (D<sub>2</sub>O, 200 MHz): δ [ppm] = 28.8.

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub>P<sub>2</sub>: m/z 375.0648, gef.: 375.0636.



**Abb. 5.7:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]-methacryl-säureamid.

#### 5.2.24 *N*<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>α</sup>-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester<sup>[93][94]</sup>



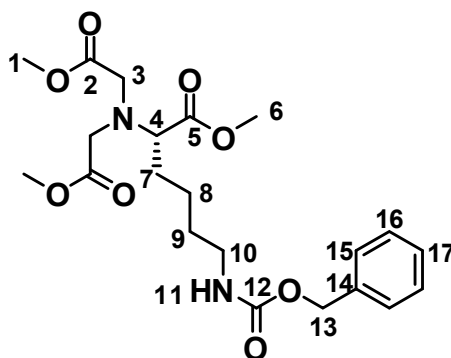


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
H-Lys(Z)-OMe	144.19	1	27.2	8.0	
Bromessigsäuremethylester	152.97	10	272		25.7
Kaliumcarbonat	138.21	20	544	75.1	
Acetonitril					250.0

**Durchführung:**

8.0 g (27.2 mmol, 1 eq.) *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine wurden in 250 mL Acetonitril suspendiert und unter Rühren mit 25.7 mL (272 mmol, 10.0 eq) Bromessigsäuremethylester und 75.1 g (544 mmol, 20.0 eq.) Kaliumcarbonat versetzt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde 18h unter Rückfluss erhitzt. Die rotbraune Suspension wurde warm über Celite filtriert und mit Acetonitril gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat 3 : 2) gereinigt. Es wurden 3.12 g *N*<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>α</sup>-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysine (10.82 mmol) als farbloses Öl erhalten.



**Ausbeute:** 3.12 g, 40%

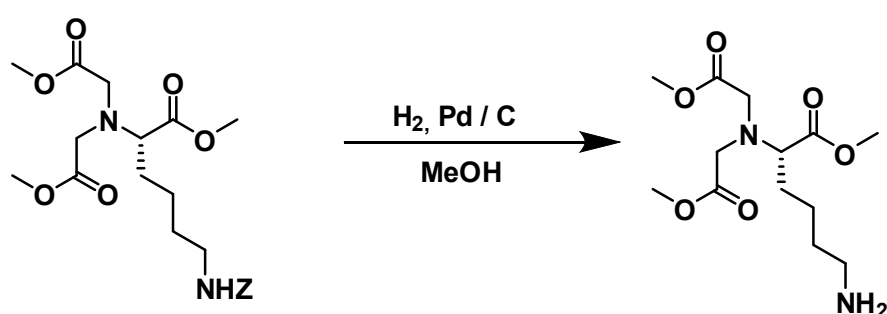
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.22 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat 3 : 2)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.34 (m, 1H, H-8), 1.43 (m, 3H, H-8, H-9), 1.69 (m, 2H, H-7), 3.18 (m, 2H, H-10), 3.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-4), 3.65 (s, 4H, H-3), 3.68 (s, 9H, H-1, H-6), 4.87 (sb, 1H, H-11), 5.10 (s, 2H, H-13), 7.31 – 7.37 (m, 5H, H-14, H-15, H-16).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 23.28 (C-8), 29.51 (C-9), 30.12 (C-7), 40.87 (C-10), 51.64 (C-6), 51.87 (C-1), 52.62 (C-3), 64.71 (C-4), 66.72 (C-13), 128.27 – 128.66 (C-15, C-16, C-17), 136.75 (C-14), 156.76 (C-12), 171.94 (C-2), 173.36 (C-5).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$ :  $m/z$  461.1894, gef.: 461.1885.

### 5.2.25 $N^\alpha$ -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester



#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
$N^\epsilon$ -Benzyloxycarbonyl- $N^\alpha$ -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester	288.32	1	2.85	1.25	
Pd / C		kat.			
		Mengen			
Methanol					15

#### Durchführung:

1.25 g  $N^\epsilon$ -Benzyloxycarbonyl- $N^\alpha$ -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (2.85 mmol) wurden in 15 mL Methanol gelöst, mit Pd/C (10% Pd) versetzt und bis

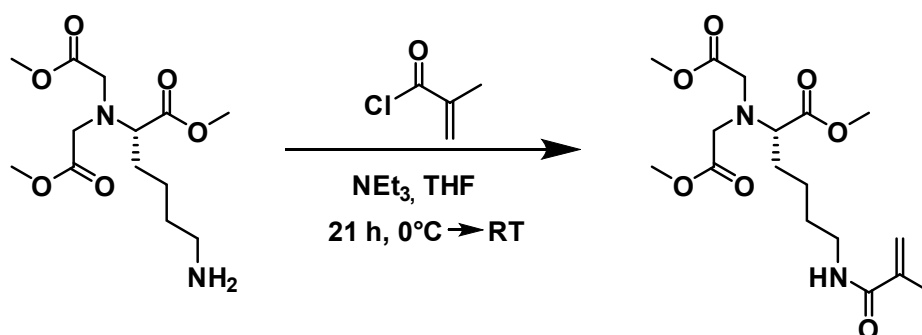
zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das ölige Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.858 g  $N^\alpha$ -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (2.82 mmol) als farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 0.858 g, 99%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.01 ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan/Ethylacetat 3 : 2)

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ : m/z 305.1727, gef.: 305.1748.

#### 5.2.26 $N^\epsilon$ -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- $N^\alpha$ -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester

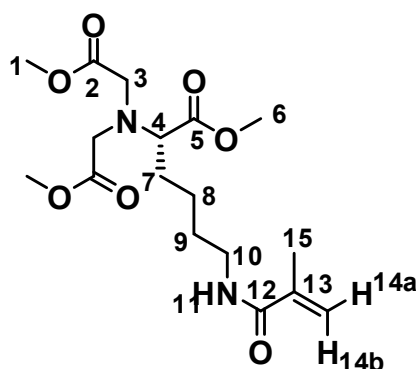


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
$N^\alpha$ -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester	304.34	1	2.92	0.89	
Triethylamin	101.19	2	5.84	0.59	0.81
Methacrylsäurechlorid	104.53	4	11.68	1.22	1.13
THF					60.00

**Durchführung:**

890 mg  $N^{\alpha}$ -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (2.92 mmol) wurden in 50 mL abs. THF gelöst und mit 810  $\mu$ L Triethylamin (5.84 mmol) versetzt, entgast und für 30 min unter Ar-Atmosphäre im Eisbad gerührt. 1.128 mL Methacrylsäurechlorid (11.68 mmol) wurden in 10 mL abs. THF gelöst und langsam innerhalb von 1h unter Rühren zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 20h gerührt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert, mit THF gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan/Ethylacetat 1 : 2) gereinigt. Es wurden 391 mg  $N^{\epsilon}$ -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- $N^{\alpha}$ -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (1.05 mmol) als farbloses Öl erhalten.



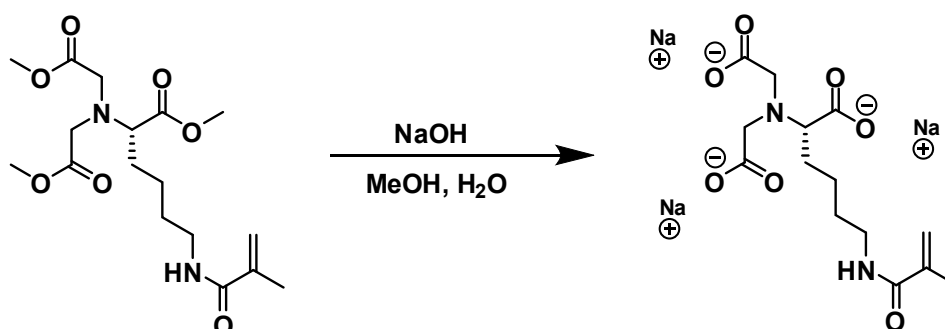
**Ausbeute:** 0.391 g, 36%.

**$R_F$ -Wert:** 0.13 ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan/Ethylacetat 1 : 2)

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.40 – 1.69 (m, 4 H, H-7, H-8), 1.86 (m, 2 H, H-9), 1.96 (s, 3 H, H-15), 3.35 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 6$  Hz, 2 H, H-10), 3.43 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.68$  Hz, 1 H, H-4), 3.63 (s, 4 H, H-3), 3.67 (s, 9 H, H-1, H-6), 5.29 (s, 1 H, H-14a), 5.69 (s, 1 H, H-14b), 6.06 (brs, 1 H, H-11).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  [ppm] = 18.8 (C-15), 39.5 (C-10), 51.6 (C-6), 51.8 (C-1), 52.6 (C-3), 64.5 (C-4), 119.3 (C-15), 140.8 (C-13), 168.9 (C-12), 171.9 (C-2), 173.2 (C-5).

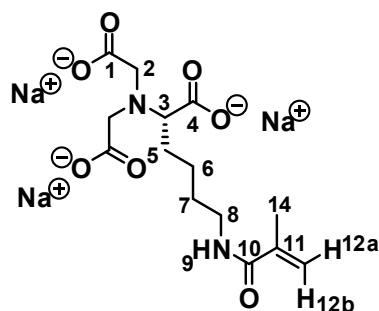
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_7$ :  $m/z$  373.1975, gef.: 373.1948.

**5.2.27**                      ***N*<sup>ε</sup>-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*<sup>α</sup>-bis(carboxymethyl)-L-lysine**
**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
<i>N</i> <sup>ε</sup> -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- <i>N</i> <sup>α</sup> -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysine methylester	372.41	1.0	0.49	150	
2 M NaOH		3.3	1.63		0.81
Aceton					3.00

**Durchführung:**

150 mg *N*<sup>ε</sup>-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*<sup>α</sup>-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysine methylester (0.49 mmol) wurden in 3 mL Methanol gelöst, mit 810 µL einer wässrigen 2 M NaOH-Lösung versetzt und bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 195 mg des *N*<sup>ε</sup>-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*<sup>α</sup>-bis(carboxymethyl)-L-lysine Trisodium-Salz (493 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.



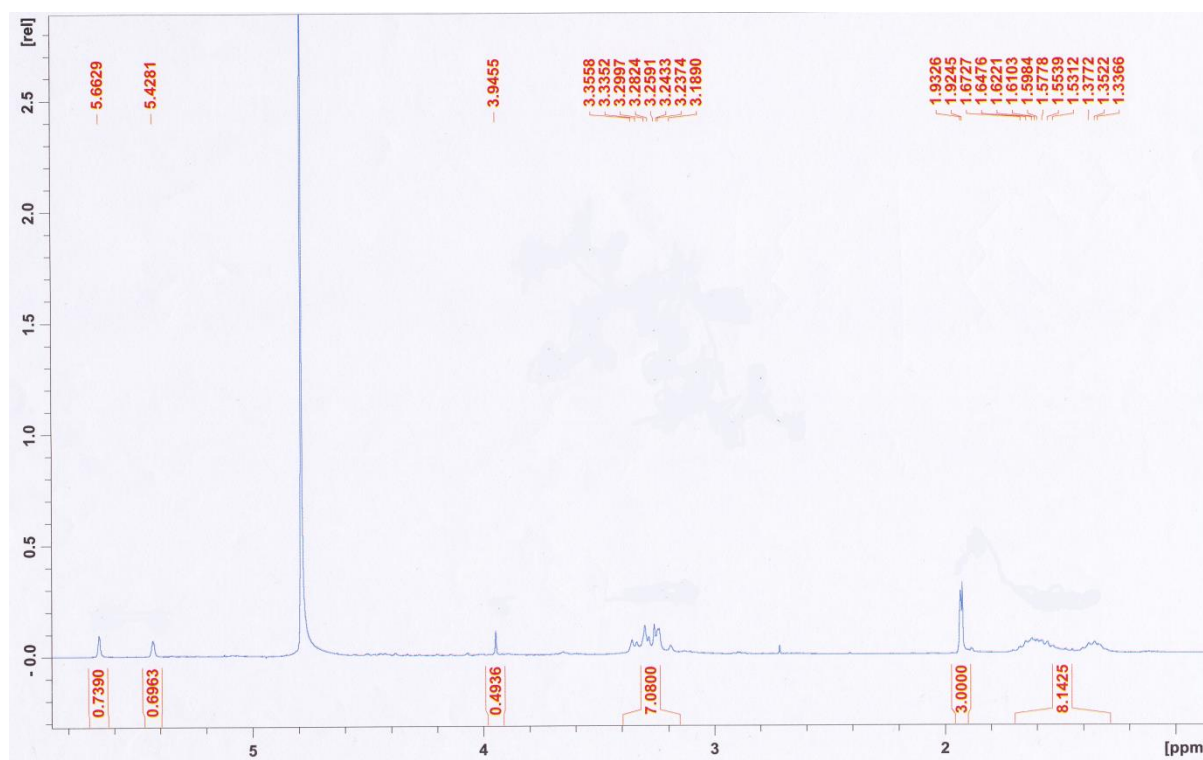
**Ausbeute:** 195 mg, quantitativ.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.00 – 0.01 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Ethylacetat 1 : 2)

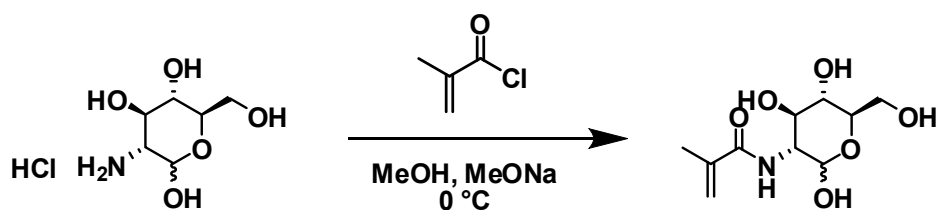
**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ [ppm] = 1.35 (m, 2 H, H-6), 1.59 (m, 4 H, H-5, H-7), 1.93 (s, 3 H, H-14), 3.18 – 3.35 (m, 7 H, H-2, H-3, H-8), 5.43 (s, 1 H, H-12a), 5.66 (s, 1 H, H-12b).

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): δ [ppm] = 16.5 (C-14), 22.3 (C-6), 27.2 (C-5/7), 28.2 (C-5/7), 38.2 (C-8), 55.3 (C-2), 67.1 (C-3), 119.3 (C-12/13), 138.2 (C-9), 170.8 (C-11), 179.0 (C-1), 180.2 (C-4).

**HRMS** (ESI, neg., MeOH): ber. für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: m/z 329.1343, gef.: 329.1349.



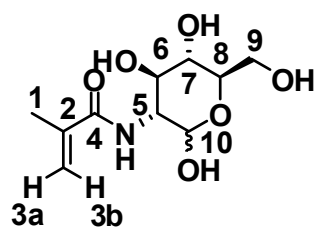
**Abb. 5.8:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von N<sup>ε</sup>-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-N<sup>α</sup>-bis(carboxymethyl)-L-lysin Trisodium-Salz.

**5.2.28 N-2-Glucosylmethacrylamid<sup>[95]</sup>****Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Glucosaminhydrochlorid	215.63	1.1	24.0	5.0	
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.0	22.4		2.16
1.5 M					
Natriummethanolat-					
Lösung					
abs. Methanol					200.00

**Durchführung:**

5.0 g (24.0 mmol, 1.1 eq.) Glucosaminhydrochlorid wurden in 200 mL abs. Methanol gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Unter Ar-Atmosphäre wurde eine Lösung aus Methacrylsäurechlorid (2.16 mL, 22.4 mmol) in 0.1 mL Schritten zugegeben und mit einer 1.5 M wässrigen Natriummethanolat-Lösung auf pH 8-9 gestellt. Nach vollständiger Zugabe des Methacrylsäurechlorids wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt und für 1h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das verbliebene Rohprodukt mit wenig Methanol aufgenommen und säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Methanol 20 : 1) gereinigt. Es wurden 0.995 g N-2-Glucosylmethacrylamid (4.02 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



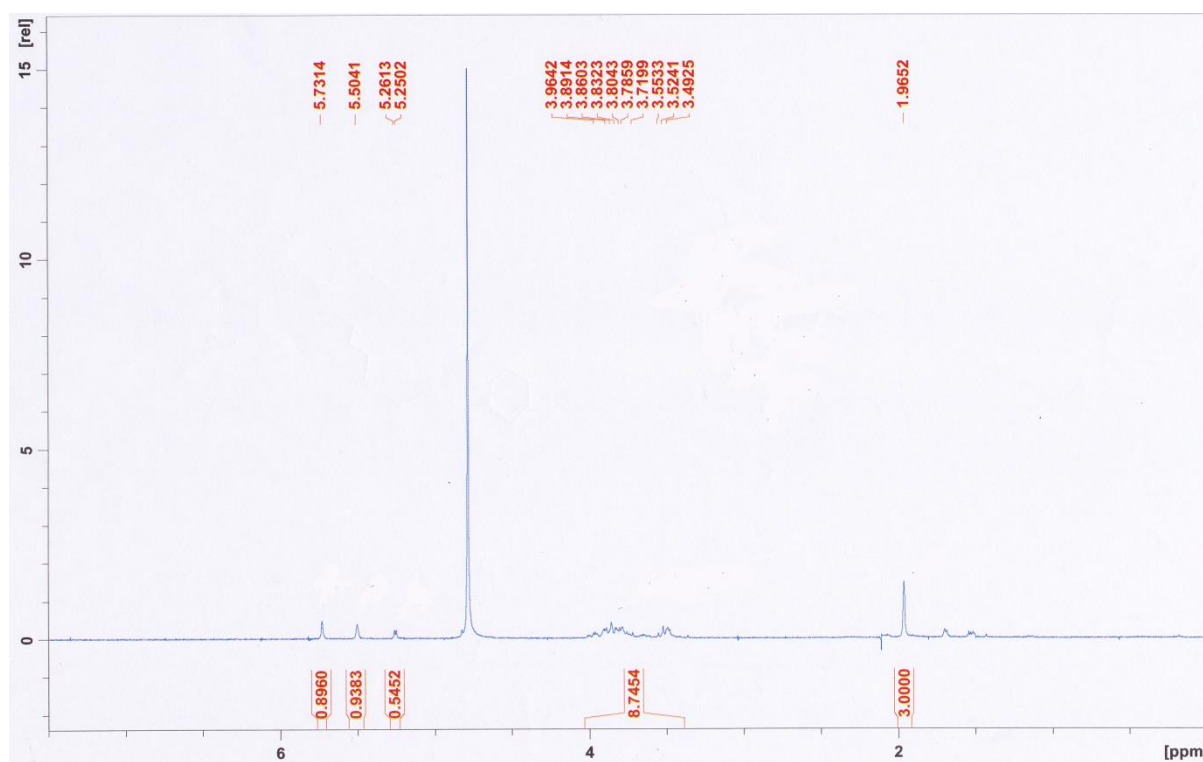
**Ausbeute:** 0.995 g, 18%.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.19 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Methanol 10 : 1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 1.97 (s, 3H, H-1), 3.49 – 3.96 (m, 6H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 5.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.33 Hz, 1 H, H-10), 5.50 (s, 1H, H-3a), 5.73 (s, 1H, H-3b).

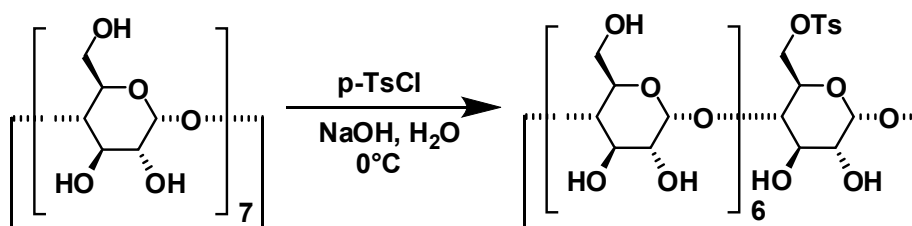
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 17.8, 17.9 (C-1), 54.4, 57.0, 70.1, 70.2, 70.6, 71.7, 73.8, 76.1, 90.9, 95.0 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 121.1, 121.3 (C-3), 139.2, 139.4 (C-2), 172.8, 172.9 (C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>Na: m/z 270.0948, gef.: 270.0975.



**Abb. 5.9:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von *N*-2-Glucosylmethacrylamid.

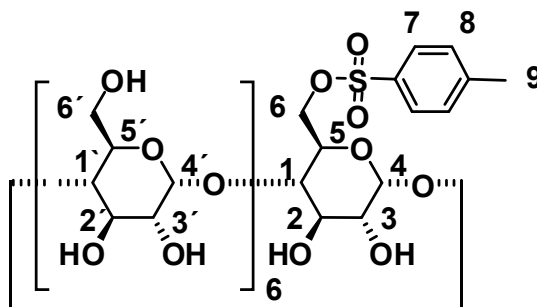


**5.2.29 6-*o*-(*p*-Tolylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin<sup>[96]</sup>****Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
$\beta$ -Cyclodextrin	1133.79	1.0	8.82	10.0	
Toluol-4-sulfonylchlorid	190.65	5.9	52.40	10.0	
0.4 M NaOH-Lösung		0.014	0.12		300

**Durchführung:**

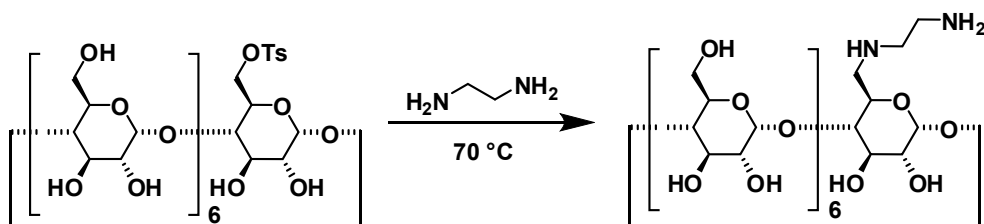
10.0 g  $\beta$ -Cyclodextrin (8.82 mmol) wurden in 300 mL einer 0.4 M wässrigen NaOH-Lösung gelöst und für ca. 30 min im Eisbad gerührt. 10.0 g Tosylchlorid (52.4 mmol) wurden in zwei Schritten zugegeben und die Reaktionslösung wurde für weitere 5h bei  $0^\circ C$  gerührt. Das nicht umgesetzte Tosylchlorid wurde abfiltriert und das Filtrat wurde mit ca. 70 mL einer 10%igen wässrigen HCl-Lösung angesäuert. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Nacht im Gefrierschrank aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurde der ausgefallene Feststoff filtriert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Es wurden 2.602 g 6-*o*-(*p*-Tolylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin (2.02 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 2.602 g, 23%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 2.34 (s, 3H, H-9), 3.29 – 3.46 (m, 14H, H-1, H-1', H-3, H-3'), 3.64 – 3.80 (m, 28 H, H-2, H-2', H-5, H-5', H-6, H-6'), 4.84 (s, 7H, H-4, H-4'), 7.34 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.93 Hz, 2 H, H-8), 7.74 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.93 Hz, 2H, H-7).

### 5.2.30 6-Deoxy-6-*N*-(2-aminoethylamino)-β-cyclodextrin

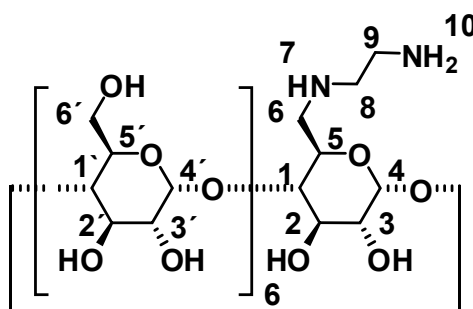


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
6- <i>o</i> -( <i>p</i> -Tolylsulfonyl)-β-cyclodextrin	1290.32	1	1.16	1.50	
Ethyldiamin	60.10	90	104.60	6.29	7.5
Ethanol					50.0

**Durchführung:**

1.50 g 6-*o*-(*p*-Tolylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin (1.16 mmol) wurden in 7.5 mL Ethylendiamin (104.6 mmol) gelöst und unter Rückfluss bei 70°C über Nacht gerührt (Ar-Atmosphäre). Das überschüssige Ethylendiamin wurde destillativ unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mit 50 mL Ethanol versetzt und für weitere 30 min unter Rückfluss gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit ca. 50 mL dest. Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde auf wenige Milliliter eingengt und mit Ethanol tropfenweise versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert, mit Hexan gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Es wurden 1.29 g 6-Deoxy-6-*N*-(2-aminoethylamino)- $\beta$ -cyclodextrin (1.06 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



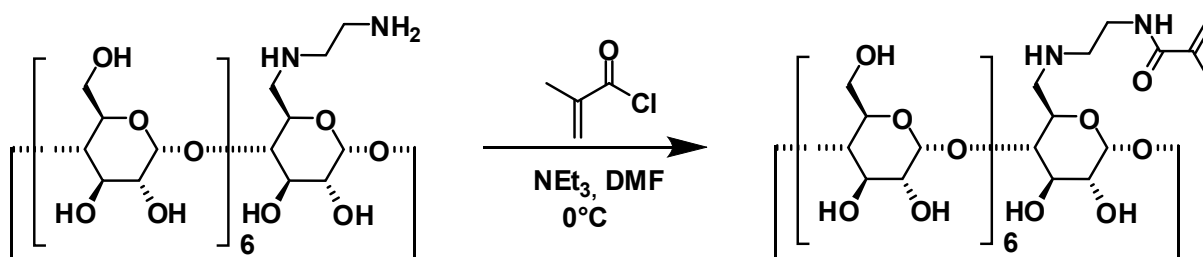
**Ausbeute:** 1.29 g, 91%.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.64 – 2.90 (m, 4 H, H-8, H-9), 3.38 – 3.58 (m, 14 H, H-1, H-1', H-3, H-3'), 3.74 – 3.92 (m, 28 H, H-2, H-2', H-5, H-5', H-6, H-6'), 4.95 (s, 7 H, H-4, H-4').

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 40.3, 51.2, 61.4, 72.8, 72.9, 73.1, 74.0, 82.3, 84.8, 102.9.

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{44}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_{34}$ :  $m/z$  1177.4358, gef.: 1177.4340.

### 5.2.31 6-Deoxy-6-*N*-(2-methacrylamidyl)ethylamino)- $\beta$ -cyclodextrin

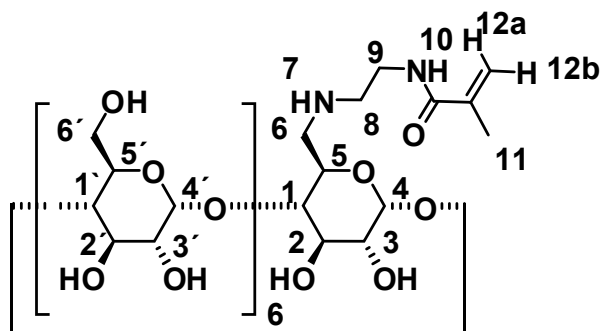


#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
6-Deoxy-6- <i>N</i> -(2-aminoethylamino)- $\beta$ -cyclodextrin	1176.42	1.0	1.06	1.29	
Triethylamin	101.19	1.2	1.32		0.18
Methacrylsäurechlorid	104.53	2.2	2.41		0.23
DMF					38.00

#### Durchführung:

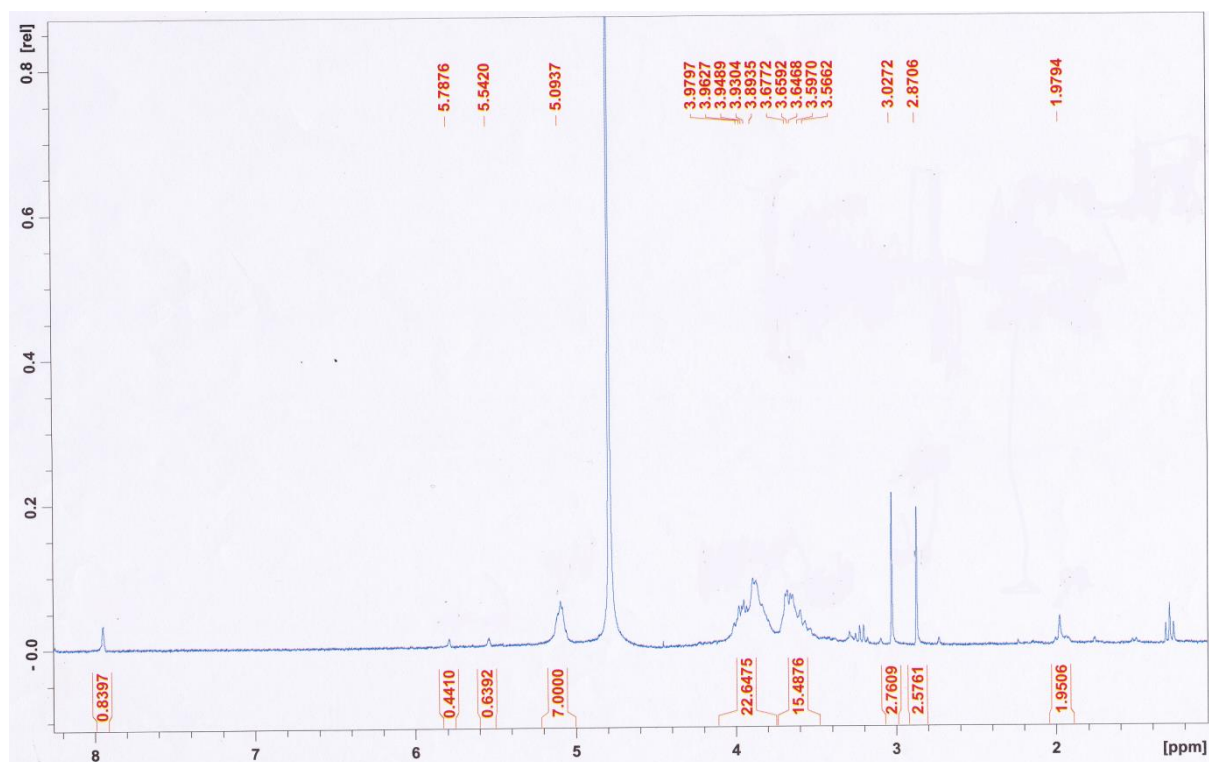
1.29 g 6-Deoxy-6-*N*-(2-aminoethylamino)- $\beta$ -cyclodextrin (1.06 mmol) wurden in 30 mL DMF suspendiert und mit 180  $\mu$ L Triethylamin (1.315 mmol) versetzt. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt und 30 min gerührt. 230  $\mu$ L Methacrylsäurechlorid (2.41 mmol) wurden in 8 mL DMF gelöst und langsam innerhalb von 2h zu dem Reaktionsgemisch getropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 48h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abkondensiert, der Rückstand in 1.5 mL dest. Wasser aufgenommen und in Ethanol eingetropft. Der ausgefallene Feststoff wurde abzentrifugiert und mit kaltem Diethylether gewaschen. Es wurden 631 mg 6-Deoxy-6-*N*-(2-methacrylamidyl)ethylamino)- $\beta$ -cyclodextrin (0.507 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



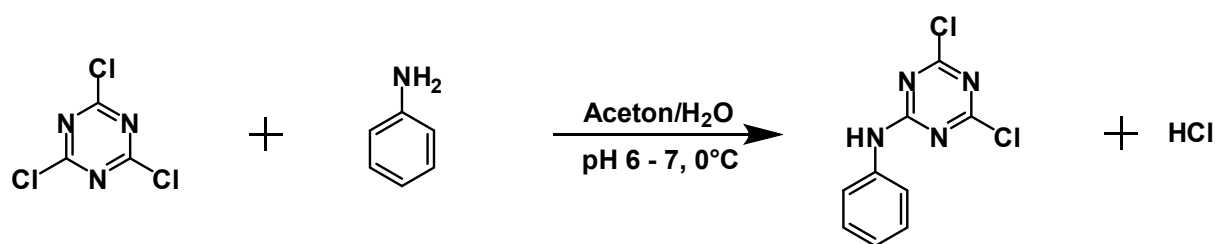
**Ausbeute:** 0.631 g, 48%.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.97 (s, 3 H, H-11), 3.17 – 3.36 (m, 4 H, H-8, H-9), 3.56 – 3.68 (m, 14 H, H-1, H-1', H-3, H-3'), 3.89 – 3.98 (m, 28 H, H-2, H-2', H-5, H-5', H-6, H-6'), 5.09 (s, 7 H, H-4, H-4'), 5.54 (s, 1H, H-12a), 5.79 (s, 1H, H-12b).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{48}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_{35}$ :  $m/z$  1245.4614, gef.: 1245.4643.



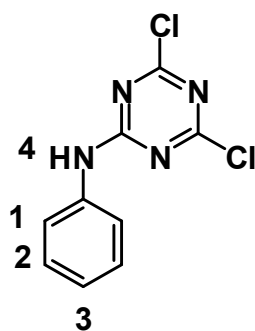
**Abb. 5.10:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von 6-Deoxy-6-N-(2-methacrylamidyl)ethylamino)- $\beta$ -cyclodextrin.

**5.2.32 2-Anilino-4,6-dichloro-s-triazin<sup>[97]</sup>****Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Anilin	93.13	1.06	212.6	19.8	
Cyanurchlorid	184.41	1.00	200.0	36.8	
Natriumhydrogencarbonat	84.01	0.05	10.0	0.84	
Aceton					250
dest. Wasser					50

**Durchführung:**

19.8 g Anilin (212.6 mmol) wurden in 50 mL Aceton gelöst und langsam zu einer Suspension aus 36.8 g Cyanurchlorid (200 mmol) in 200 mL Aceton, 50 mL Wasser und 50 g Eis unter Rühren und Kühlung mittels Eisbad zugetropft. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Natriumhydrogencarbonat (840 mg) auf 6-7 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zum vollständigen Umsatz bei 0°C gerührt (TLC-Kontrolle, Dichlormethan, Anfärbung mit Ehrlich's Reagenz). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das ausgefallene Produkt wurde filtriert, mit 2 M HCl gewaschen und aus Dichlormethan umkristallisiert. Es wurden 34.72 g 2-Anilino-4,6-dichloro-s-triazin (144 mmol) als weißer Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 34.72 g, 72%

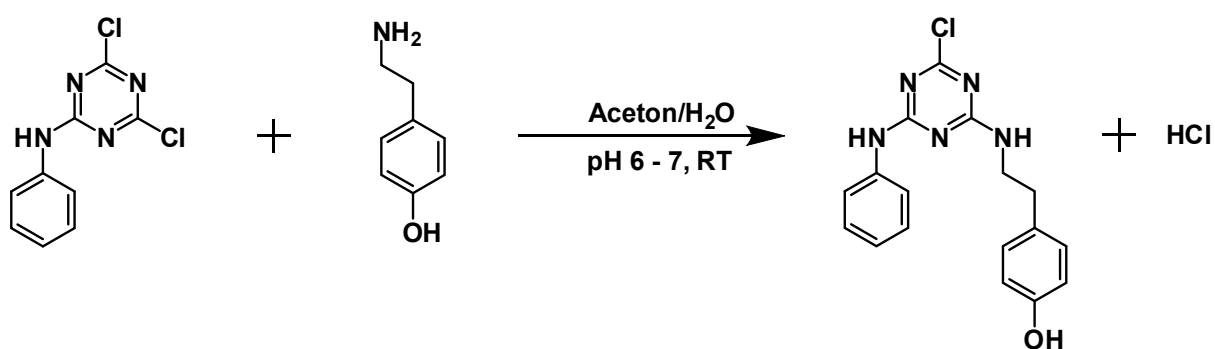
**Schmelzpunkt:** 336°C

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.46 (Dichlormethan)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 7.23 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.5 Hz, 1 H, H-3), 7.38 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 2 H, H-2), 7.53 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 2 H, H-1).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>: m/z 241.0048, gef.: 241.0058.

### 5.2.33 2-Anilino-4-chloro-6-tyramino-s-triazin<sup>[97]</sup>

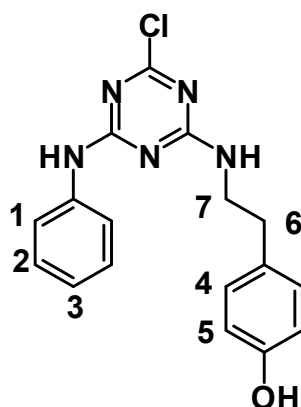


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
2-Anilino-4,6-dichloro-s-triazin	241.08	1.0	20	4.82	
Tyramin	137.18	1.0	20	2.74	
Natriumhydrogencarbonat	84.01	0.05	1	0.08	
Aceton					150
dest. Wasser					10

**Durchführung:**

4.82 g 2-Anilino-4,6-dichloro-s-triazin (20 mmol) wurden in 100 mL Aceton gelöst und unter Rühren mit einer Lösung aus 2.74 g Tyramin (20 mmol) in 50 mL Aceton und 10 mL dest. Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Rückfluss auf 50°C erwärmt und mit 80 mg Natriumhydrogencarbonat auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt. Nach vollständiger Umsetzung (TLC-Kontrolle, Ninhydrin) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das verbliebene Rohprodukt in Aceton (50 mL) aufgenommen und filtriert. Das Produkt wurde mit Wasser gefällt und lyophilisiert. Es wurden 5.06 g 2-Anilino-4-chloro-6-tyramino-s-triazin (14.8 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 5.06 g, 74%

**Schmelzpunkt:** 202°C

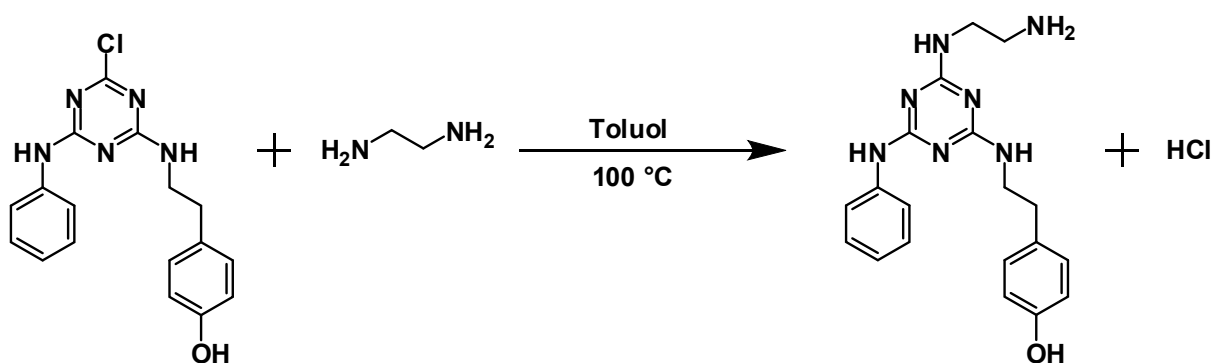
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.7 (Dichlormethan/Isopropanol 24 : 1)



**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 2.75 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$  Hz, 2 H, H-6), 3.56 (dt  $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$  Hz, 2 H, H-7), 6.72 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.4$  Hz, 2 H, H-5), 7.01 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.4$  Hz, 2 H, H-4), 7.10 (m, 1 H, H-3), 7.28 (m, 2 H, H-2), 7.63 (m, 2 H, H-1).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_5\text{O}$ :  $m/z$  342.1122, gef.: 342.1151.

### 5.2.34 2-(-2-Aminoethylamino)-4-anilino-6-tyramino-s-triazin<sup>[97]</sup> (ApA)



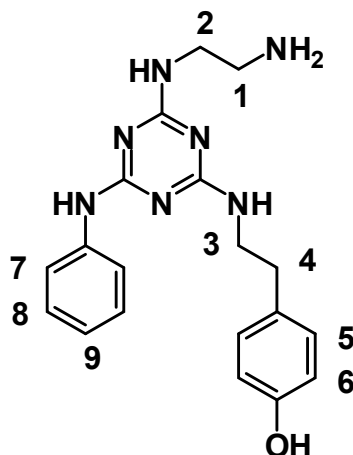
#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
2-Anilino-4-chloro-6-tyramino-s-triazin	341.79	1.0	7.3	2.5	
Ethylendiamin	60.10	12.3	90.0		6
Toluol					20

#### Durchführung:

2.5 g 2-Anilino-4-chloro-6-tyramino-s-triazin (7.3 mmol) wurden in 20 mL Toluol gelöst und mit 6 mL Ethylendiamin (90.0 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) über Nacht bei 100°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend mit

Wasser/Methanol versetzt, um letzte Spuren von Ethylendiamin zu entfernen. Das Rohprodukt wurde schließlich in Methanol/HCl (5 M) gelöst und das Produkt durch Entfernen des Methanols ausgefällt. Es wurden 2.1 g 2-(2-Aminoethylamino)-4-anilino-6-tyramino-s-triazin (5.75 mmol) als leicht rötlichen Feststoff erhalten.

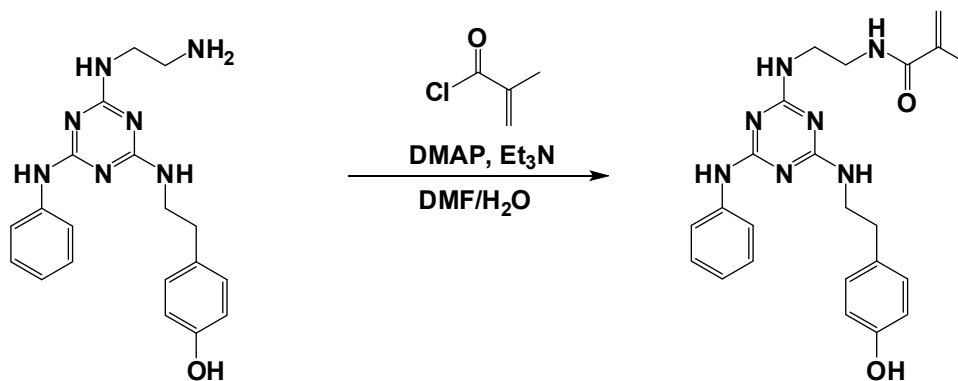


**Ausbeute:** 2.1 g, 80%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.6 (Chloroform/Methanol/Essigsäure = 8 : 4 : 0.5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 2.71 (brs, 2H, H-4), 3.02 (brs, 2 H, H-1), 3.50 (brs, 2 H, H-3), 3.58 (brs, 2 H, H-2), 6.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 2 H, H-6), 7.06 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 2 H, H-5), 7.12 (m, 1 H, H-9), 7.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2 H, H-8), 7.61 (brs, 2 H, H-7), 8.21 (brs, 3 H, NH).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>7</sub>O: m/z 366.2042, gef.: 366.2058.

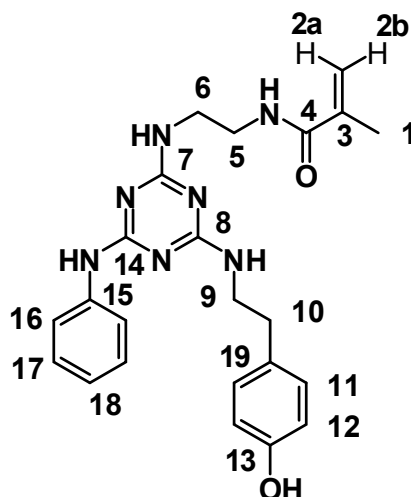
**5.2.35      *N*-(2-(4-(4hydroxyphenylamino)-6-(phenylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)methacrylamid**

**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [μL]
2-(2-Aminoethylamino)-4-anilino-6-tyramino-s-triazin	365.43	1.0	0.574	0.2	
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.5	0.862		84.80
Triethylamin	101.19	1.2	0.688		95.92
DMAP		kat.			
		Mengen			
DMF					40 000

**Durchführung:**

200 mg 2-(2-Aminoethylamino)-4-anilino-6-tyramino-s-triazin (0.574 mmol) wurden in 20 mL DMF gelöst und mit 95.92 μl Triethylamin (0.688 mmol) sowie katalytische Mengen an DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde entgast und für 30 min bei 0°C gerührt. 84.8 μL Methacrylsäurechlorid gelöst in 20 mL DMF wurden langsam innerhalb von 2h zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abkondensiert und das Rohprodukt

säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat/Methanol/Essigsäure, 8 : 1 : 0.5) gereinigt. Es wurden 169.1 mg *N*-(2-(4-(4hydroxyphenylamino)-6-(phenylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)methacrylamid (0.39 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.



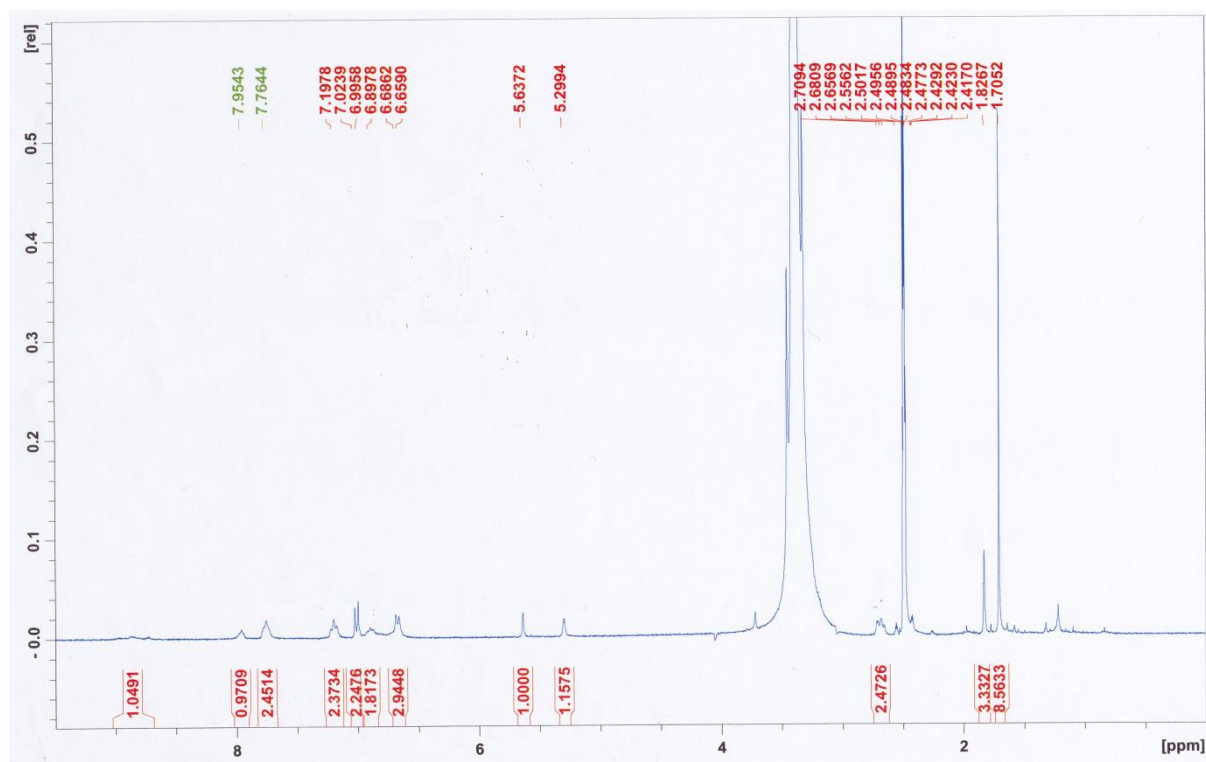
**Ausbeute:** 0.169 g, 68%

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.68 (Ethylacetat/Methanol/Essigsäure 8 : 1 : 0.5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz): δ [ppm] = 1.83 (s, 3 H, H-1), 2.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 2H, H-10), 3.02 (brs, 2 H, H-5), 3.50 (brs, 2 H, H-9), 3.58 (brs, 2 H, H-6), 5.30 (s, 1 H, H-2a), 5.63 (s, 1 H, H-2b), 6.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 2 H, H-12), 6.90 (m, 1 H, H-18), 7.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 2 H, H-11), 7.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2 H, H-17), 7.76 (brs, 2 H, H-16), 8.21 (brs, 1 H, NH).

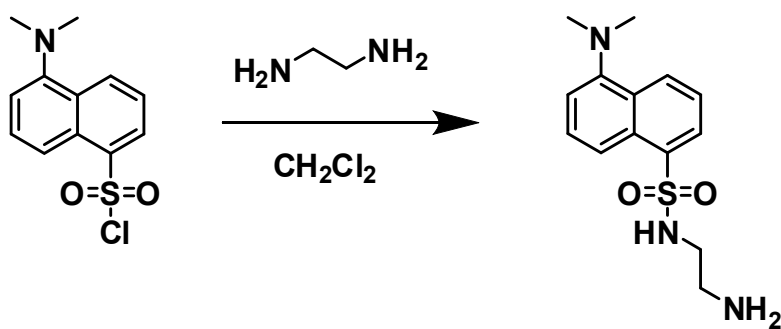
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 18.5 (C-1), 35.7 (C-10), 39.5 (C-5), 44.3 (C-9), 48.9 (C-6), 115.8 (C-12), 116.3 (C-16), 118.8 (C-18), 124.0 (C-2), 129.1 (C-11), 129.6 (C-17), 132.0 (C-19), 141.3 (C-3), 143.0 (C-15), 155.7 (C-13), 159.3 (C-8), 162.5 (C-7), 166.7 (C-14), 168.9 (C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> : m/z 434.2304, gef.: 434.2335.



**Abb. 5.11:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von *N*-(2-(4-(4hydroxyphenylamino)-6-(phenylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)methacrylamid.

### 5.2.36 *N'*-(5-*N,N*-dimethylaminonaphtylsulfonylamido)ethylamine<sup>[98]</sup>

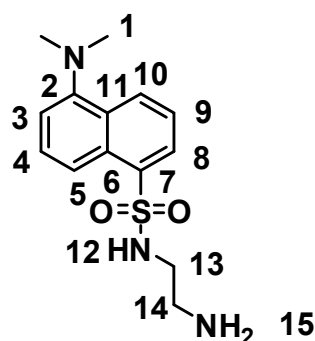


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Dansylchlorid	269.72	1.0	9.26	2.5	
Ethylendiamin	60.10	29.2	270		28.8
Dichlormethan					140.0

**Durchführung:**

28.8 mL Ethylendiamin (270 mmol) wurden in 100 mL Dichlormethan gelöst und mit Hilfe eines Eisbades auf ca. 0°C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus 2.5 g Dansylchlorid gelöst in 40 mL Dichlormethan zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und mit einer 1 M wässrigen HCl-Lösung bis zum Farbumschlag der Lösung von gelb nach orange angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und der pH-Wert mit einer 5 M NaOH-Lösung auf 9 eingestellt (erneuter Farbumschlag). Nach erneuter Extraktion mit Dichlormethan (3 x 20 mL) wurden die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.135 g *N*-(5-*N,N*-dimethylaminonaphtylsulfonylamido)ethylamine (7.28 mmol) als gelber Feststoff erhalten.



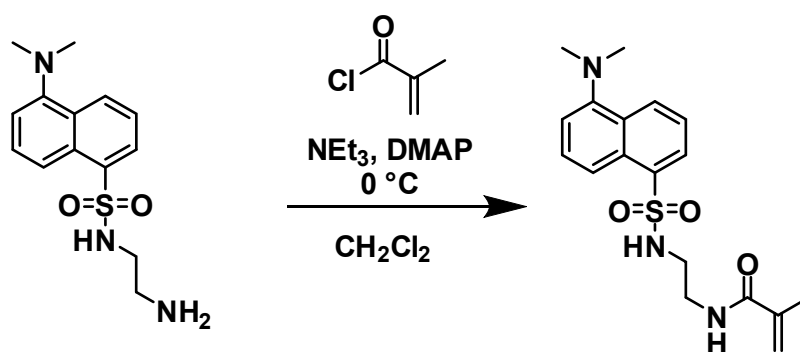
**Ausbeute:** 2.135 g, 79%

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 2.68-2.72 (m, 2 H, H-14), 2.89-2.93 (m, 8 H, H-1, 13), 7.19 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 0.7 Hz, 1 H, H-3), 7.50-7.60 (m, 2 H, H-5, H-8), 8.24-8.32 (m, 2 H, H-4, H-10), 8.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 1 H, H-9).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 39.9 (C-14), 41.6 (C-1), 44.9 (C-13), 114.7 (C-3), 124.7 (C-5), 125.9 (C-8), 126.5 (C-9), 127.9 (C-4), 128.6 (C-10), 132.3 (C-11), 133.4 (C-6), 143.9 (C-7), 151.7 (C-2).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  : m/z 294.1276, gef.: 294.1295.

### 5.2.37 *N*-(2-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)-methacrylamid<sup>[99]</sup>



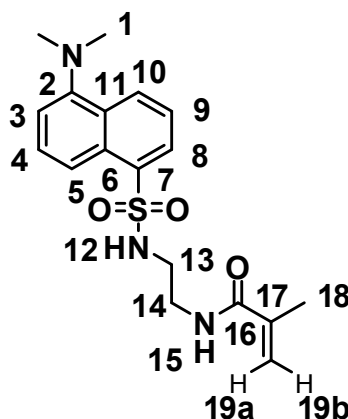
#### Ansatz:

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -(5- <i>N,N</i> -dimethylaminonaphthyl-sulfonylamido)ethylaniline	293.38	1.0	7.3	2.14	
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.1	8.0		0.76
Triethylamin	101.19	1.1	8.0		1.11
Dichlormethan					165.00

#### Durchführung:

2.14 g *N*-(5-*N,N*-dimethylaminonaphthylsulfonylamido)ethylaniline (7.28 mmol) wurden in 125 mL Dichlormethan gelöst und mit 1.11 mL Triethylamin versetzt. Unter Rühren wurde eine Lösung von 762  $\mu\text{L}$  Methacrylsäurechlorid in 40 mL Dichlormethan

zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz (TLC-Kontrolle) gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Ethylacetat/Hexan 1 : 1) gereinigt. Es wurden 2.133 g *N*-(2-(5-(dimethylamino)naphtalen-1-sulfonamido)ethyl)-methacrylamid (5.90 mmol) als neon gelb/grüner Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 2.133 g, 81%.

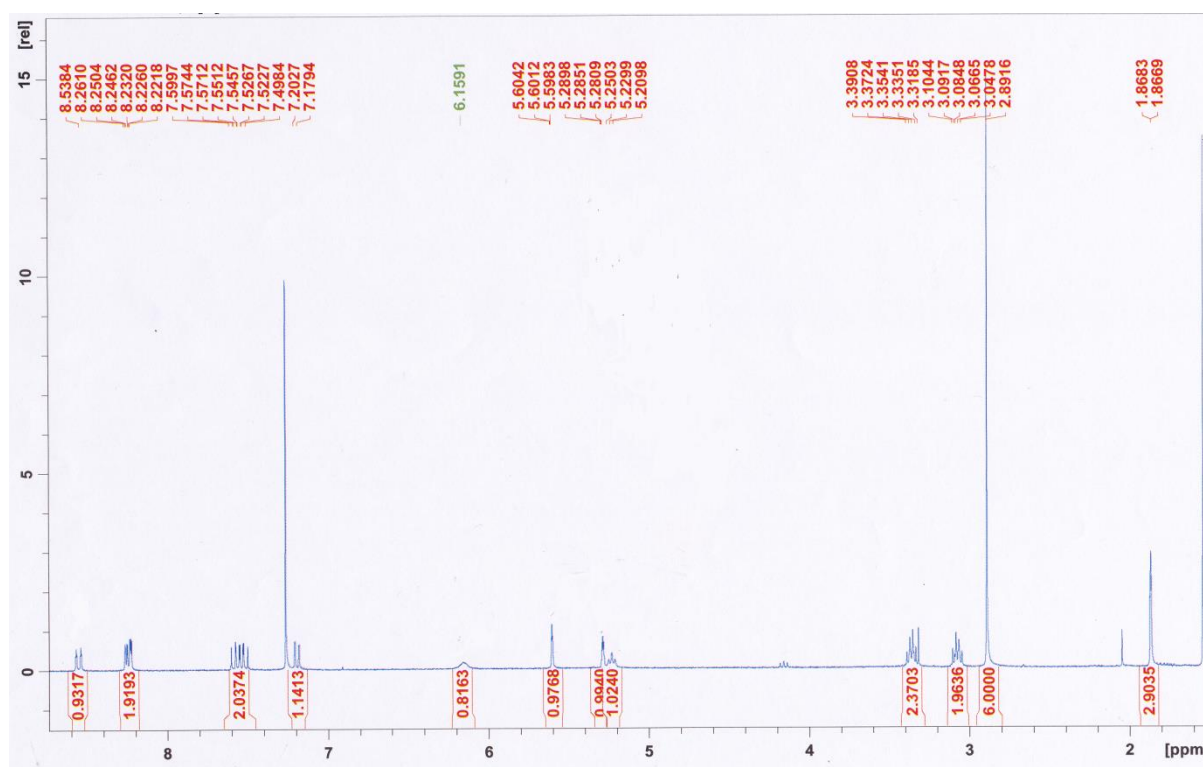
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.68 (Ethylacetat/Hexan 1 : 1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.87 (s, 3 H, H-18), 2.89 (s, 6 H, H-1), 3.04-3.10 (m, 2 H, H-14), 3.32-3.39 (m, 2 H, H-13), 5.23 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, 1 H, H-15), 5.29 (s, 1 H, H-19a), 5.60 (s, 1 H, H-19b), 6.16 (brs, 1 H, H-12), 7.19 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 1 H, H-3), 7.50-7.60 (m, 2 H, H-5, H-8), 8.22-8.26 (m, 2 H, H-4, H-10), 8.56 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 1 H, H-9).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 18.4 (C-18), 38.9 (C-14), 40.6 (C-1), 43.9 (C-13), 113.5 (C-3), 126.9 (C-5), 124.1 (C-19), 125.3 (C-8), 126.2 (C-9), 127.0 (C-4), 128.2 (C-10), 132.4 (C-11), 133.2 (C-6), 141.5 (C-17), 142.5 (C-7), 151.5 (C-2), 166.8 (C-16).

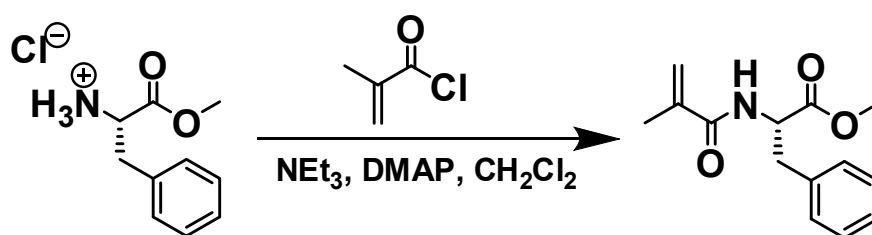
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SNa : *m/z* 384.1352, gef.: 384.1385.





**Abb. 5.12:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von *N*-(2-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)-methacrylamid.

### 5.2.38 2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäuremethylester<sup>[100]</sup>

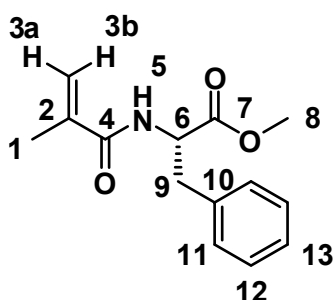


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
H-Phe-OMe	215.68	1.0	1.27	255	
Hydrochlorid					
Methacrylsäurechlorid	104.53	2.1	2.74	286	0.27
Triethylamin	101.19	3.5	4.45	450	0.62
DMAP	122.17	kat.			
Mengen					
Dichlormethan					25.00

**Durchführung:**

255 mg H-Phe-OMe Hydrochlorid (1.27 mmol) wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst, mit 620  $\mu$ L Triethylamin (4.45 mmol) und einer katalytischen Mengen DMAP versetzt und anschließend 30 min im Eisbad gerührt. 270  $\mu$ L Methacrylsäurechlorid (2.74 mmol) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst, unter Rühren langsam zugetropft und 2h im Eisbad und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 30 mL 0.6 M wässriger NaOH gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan/Ethylacetat 4 : 1). Es wurden 267 mg 2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäure-methylester (1.08 mmol) als farbloses Öl erhalten.



**Ausbeute:** 0.267 g, 85%.

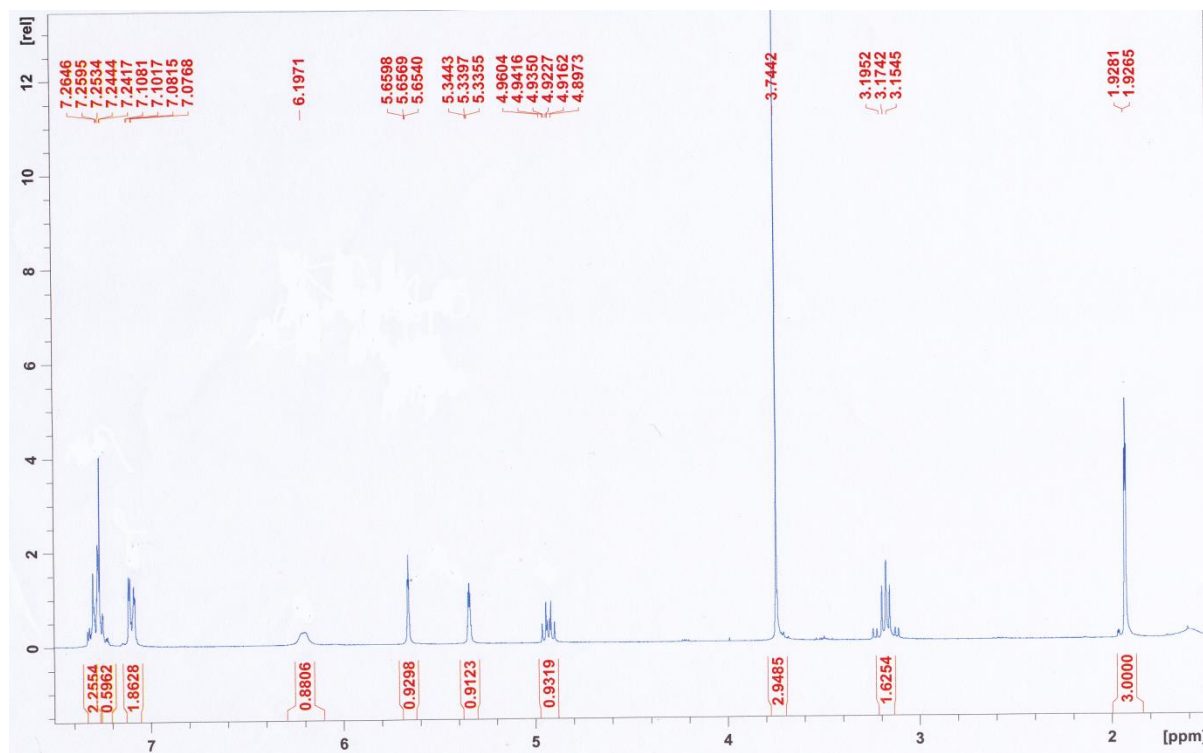
**$R_F$ -Wert:** 0.18 (Ethylacetat/Cyclohexan 1 : 4).

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.93 (s, 3 H, 1), 3.16 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$  Hz, 1 H, H-9), 3.18 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, 1 H, H-9), 3.74 (s, 3 H, H-4), 4.92 (m, 1 H, H-6), 5.34 (s, 1

H, H-3a), 5.66 (s, 1 H, H-3b), 6.20 (brs, 1 H, H-5), 7.08 – 7.11 (m, 2 H, H-11), 7.24 – 7.26 (m, 3 H, H-12, H-13).

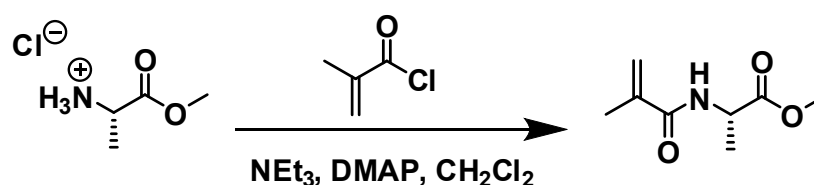
**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 18.3 (C-1), 37.6 (C-9), 52.2 (C-5), 53.0 (C-6), 120.0 (C-3), 127.1 (C-13), 128.5 (C-11), 129.1 (C-12), 135.6 (C-10), 139.3 (C-2), 167.4 (C-4), 171.8 (C-7).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_3$  :  $m/z$  248.1287, gef.: 248.1285.



**Abb. 5.13:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) von 2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäuremethylester.

### 5.2.39 2-(2-Methylacryloylamino)propionsäuremethylester<sup>[100]</sup>

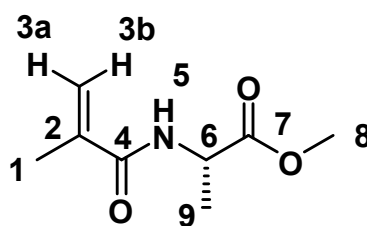


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
H-Ala-OMe Hydrochlorid	139.58	1.0	2.55	257	
Methacrylsäurechlorid	104.53	2.0	5.10		0.48
Triethylamin	101.19	3.5	8.93		1.22
DMAP	122.17	kat.			
Mengen					
Dichlormethan					25.00

**Durchführung:**

257 mg H-Ala-OMe Hydrochlorid (2.55 mmol) wurden in 20 mL Dichlormethan abs. gelöst, mit 1.22 mL Triethylamin (8.93 mmol) und katalytischen Mengen DMAP versetzt und 30 min unter Eiskühlung gerührt. 480 µL Methacrylsäurechlorid (5.10 mmol) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst, unter Rühren zugetropft und 1h bei 0°C und 15h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 30 mL 0.6 M wässriger NaOH gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 288 mg 2-(2-Methylacryloylamino)-propionsäuremethylester (1.68 mmol) als farbloses Öl erhalten.



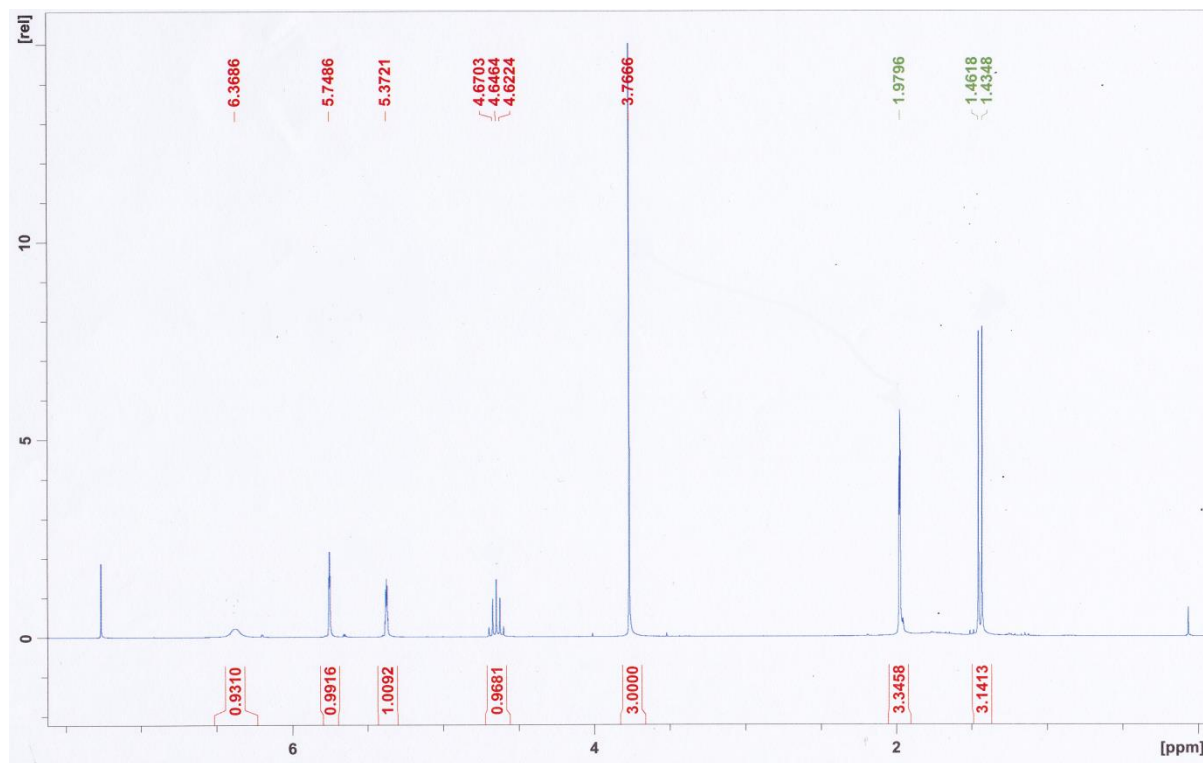
**Ausbeute:** 0.288 g, 66%.

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.26 (Ethylacetat/Hexan 1 : 2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ [ppm] = 1.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 3 H, H-9), 1.98 (s, 3 H, H-1), 3.77 (s, 3 H, H-8), 4.65 (quint, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 1 H, H-6), 5.37 (s, 1 H, H-3a), 5.75 (s, 1 H, H-3b), 6.37 (brs, 1 H, H-5).

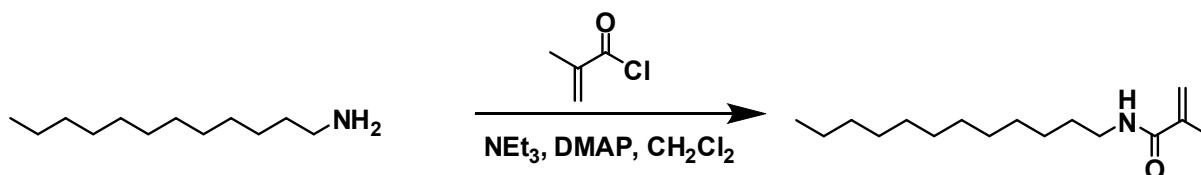
**$^{13}\text{C}$ -NMR** (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 18.5 (C-1, C-9), 48.1 (C-8), 52.4 (C-6), 120.2 (C-3), 139.5 (C-2), 167.6 (C-4), 173.7 (C-7).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_3$  :  $m/z$  172.0974, gef.: 172.0947.



**Abb. 5.14:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 2-(2-Methylacryloylamino)-propionsäuremethylester.

## 5.2.40 Dodecylmethacrylamid

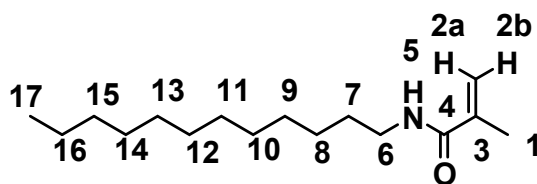


**Ansatz:**

Edukte	M [g/mol]	eq.	n [mmol]	m [mg]	V [mL]
Dodecylamin	185.35	1.0	2.69	500	
Methacrylsäurechlorid	104.53	1.2	3.22		0.31
Triethylamin	101.19	1.2	3.22		0.45
DMAP	122.17	kat.			
Mengen					
Dichlormethan					60.00

**Durchführung:**

500 mg Dodecylamin (2.69 mmol) wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und mit 450  $\mu$ L Triethylamin (3.22 mmol) und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus 310  $\mu$ L Methacrylsäurechlorid (3.22 mmol) in 10 mL Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung mit einer 1 N wässrigen NaOH-Lösung (3 x 50 mL) und anschließend mit einer 1 N wässrigen HCl-Lösung (3 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 601 mg Dodecylmethacrylamid (2.37 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

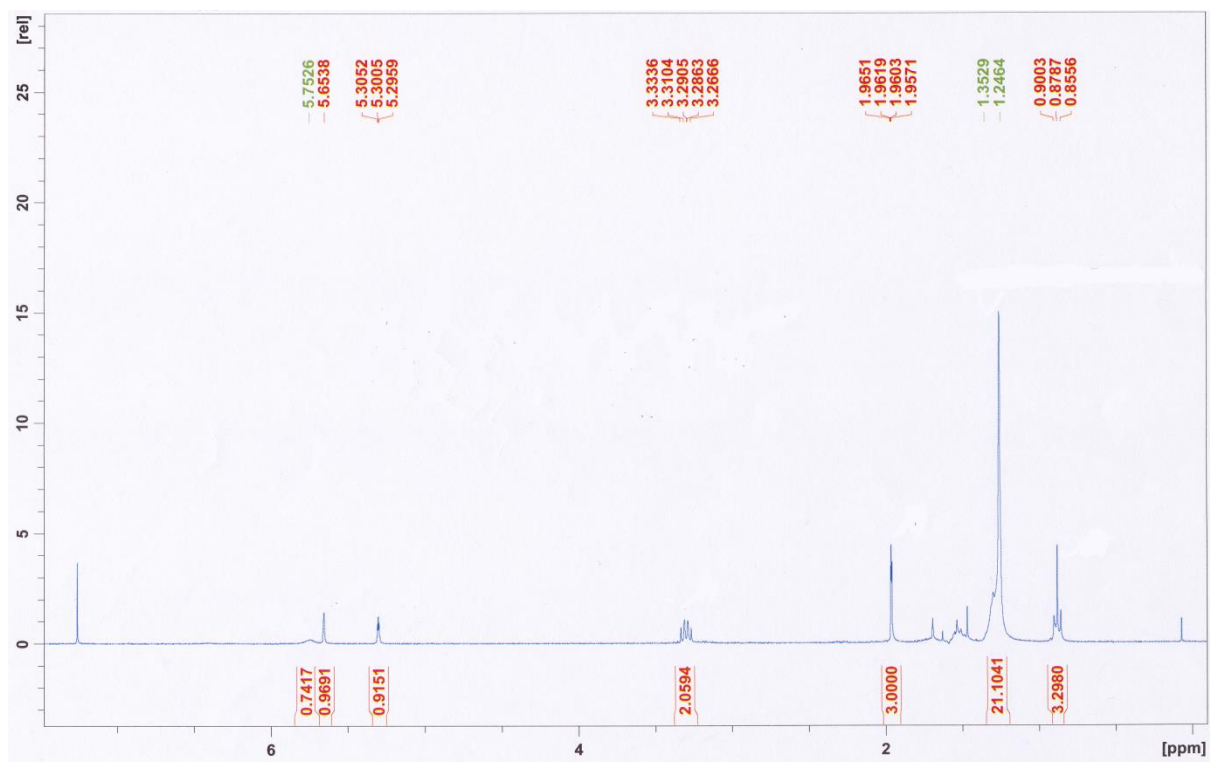


**Ausbeute:** 0.601 g, 88%.

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $^3J$  = 6.48 Hz, 3 H, H-17), 1.25-1.35 (m, 21 H, H-7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), 1.96 (s, 3 H, H-1), 3.27-3.33 (m, 2 H, H-6), 5.30 (t, 1 H, H-2a), 5.65 (s, 1 H, H-2b), 5.75 (brs, 1 H, H-5).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.2 (C-17), 18.6 (C-2), 22.7, 27.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 32.1 (C-7 – C-16) 40.6 (C-6), 124.4 (C-1), 140.3 (C-3), 168.8 (C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{NO}$  :  $m/z$  254.2484, gef.: 254.2457.



**Abb. 5.15:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von Dodecylmethacrylamid.

## 5.3. Synthese der Polymere

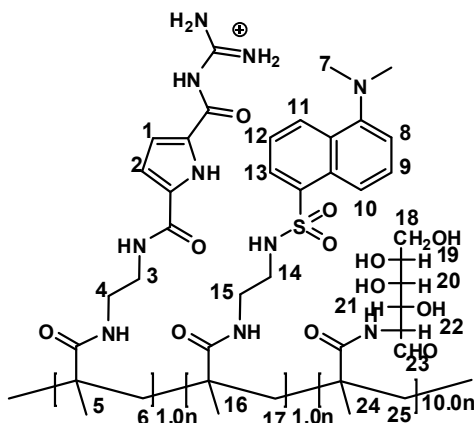
### 5.3.1 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Polymere

Es wurden als erstes Stammlösungen der verschiedenen Monomere und des Radikalstarters AIBN angesetzt, indem jeweils 100 mg des entsprechenden Monomers/AIBN in 1-2 mL DMF gelöst wurden. Im Falle einer schlechten Löslichkeit wurden entsprechende Mengen an dest. Wasser hinzugegeben. Die Stammlösungen wurden anschließend nach dem „freeze and exhaust – Prinzip“ entgast. Dafür wurden die Stammlösungen in flüssigen Stickstoff eingefroren, evakuiert und langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und anschließend mit Argon geflutet. Unter Schutzgas wurden 1 mL Polymerisationsgefäße mit beliebigen Verhältnissen der Monomere befüllt. Die Menge an AIBN wurde so gewählt, dass die Endkonzentration bei 5 mol% liegt. In wenigen Ausnahmefällen wurde diese bis 20 mol% erhöht, um Polymere mit kleineren Molgewichten zu erzielen. Die befüllten Polymerisationsgefäße wurden gut verschlossen für 7 Tage bei 60°C bzw. für 1-3 Tage bei 70°C im Thermomixer bei 600 rpm geschüttelt. Zur Aufarbeitung wurden die Reaktionslösungen mit wenigen Millilitern dest. Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in dest. Wasser gelöst und über einer 3 MWK Membran (Ultrafiltrations-Tubes der Firma Millipore) mit Hilfe einer Zentrifuge ultrafiltriert. Hierbei ist es wichtig, dass die Polymerlösungen kein DMF enthalten, da sich sonst die Membranen zersetzen können. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden die erhaltenen Polymere mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und GPC auf Umsatz, Stöchiometrie und Molekulargewichtsverteilung überprüft. Aufgrund der Signalverbreiterung und Überlappung der NMR-Signale konnten keine Kopplungskonstanten angegeben werden. Für die Integration ist der entsprechende Anteil Bisphosphonat bzw. CBS als ein Äquivalent angenommen worden. Aus den Integrationsverhältnissen der Protonen, die eindeutig zugeordnet werden konnten, sind die relativen Monomerverhältnisse bestimmt worden.



### 5.3.2 Charakterisierung der dargestellten Polymere

### **5.3.2.1: Polymer 1**



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.69 - 2.12 (m, H-5, H-6, H-16, H-17), 2.63 - 4.02 (m, H-3, H-4, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22), 5.02 - 5.24 (m, H-23).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Polyethylenglycol – Standard:

$$\bar{M}_w = 3\,021\text{ g/mol}, \bar{M}_n = 2\,845\text{ g/mol}; \text{PDI}_1 = 1.06$$

$$\bar{M}_{w2} = 363 \text{ g/mol}, \bar{M}_{n2} = 256 \text{ g/mol}; \text{PDI}_2 = 1.42$$

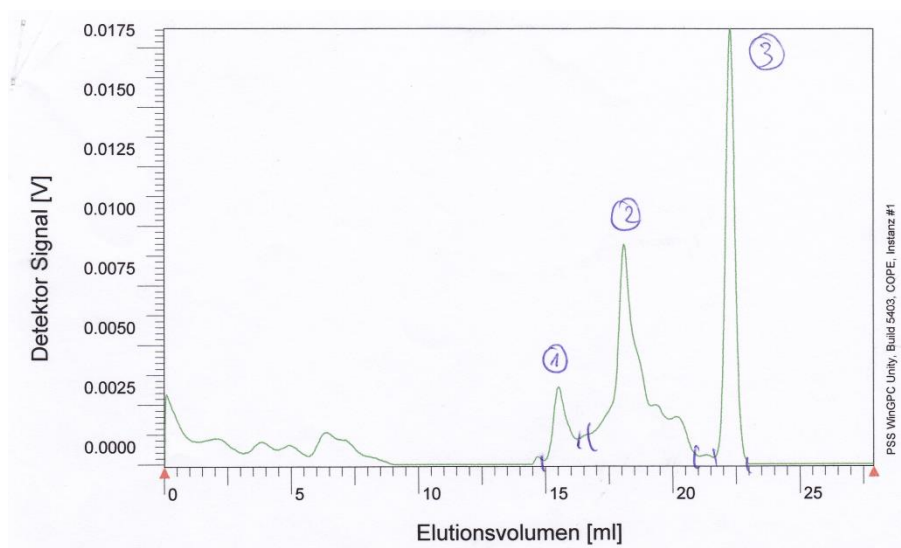
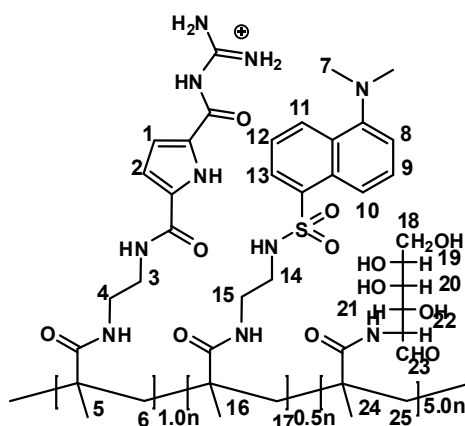


Abb. 5.16: GPC-Spektrum von Polymer 1.

### 5.3.2.2: Polymer 2

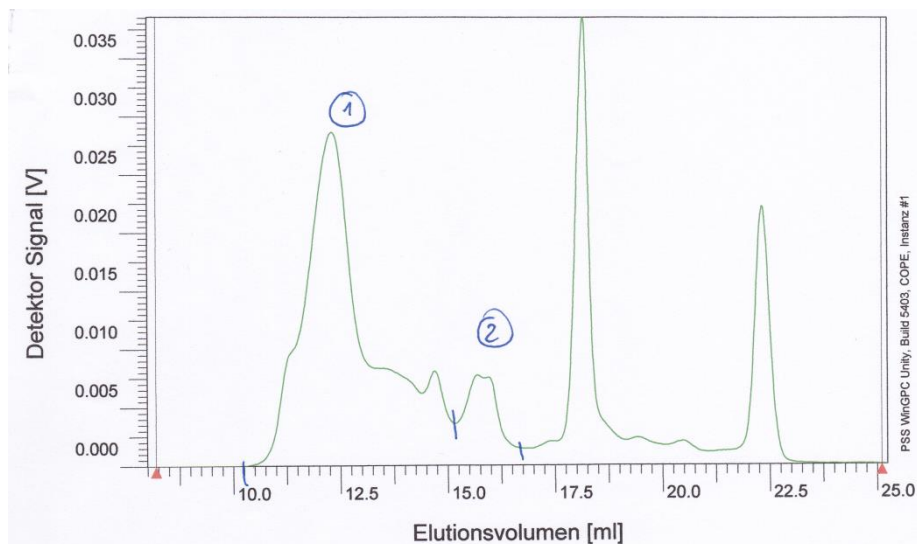
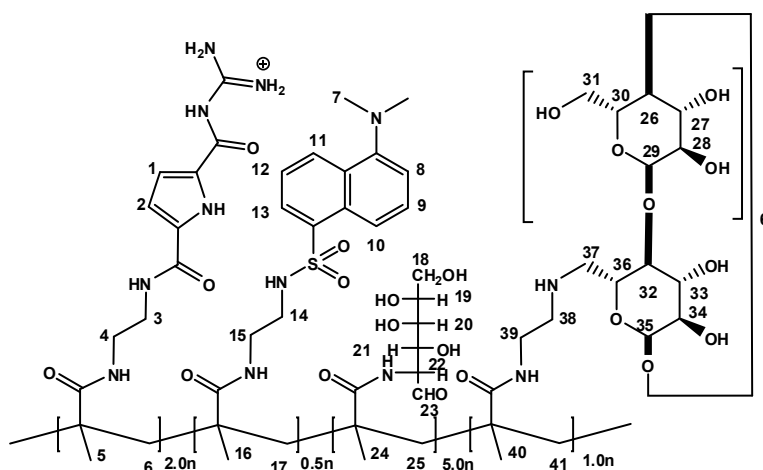


**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.72 - 2.13 (m, H-5, H-6, H-16, H-17), 2.69 - 4.06 (m, H-3, H-4, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22), 5.07 - 5.29 (m, H-23).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Polyethylenglycol – Standard:

 $\bar{M}_w = 86\,350\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 29\,157\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.96$  $\bar{M}_{w2} = 2\,699\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 2\,475\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.2$ **Abb. 5.17:** GPC-Spektrum von Polymer 2.**5.3.2.3 Polymer 3**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.64-2.05 (m, H-5, H-6, H-16, H-17, H-24, H-25, H-40, H-41), 2.58-4.11 (m, H-3, H-4, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22,

H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39), 4.87-5.08 (m, H-23).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

### Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :

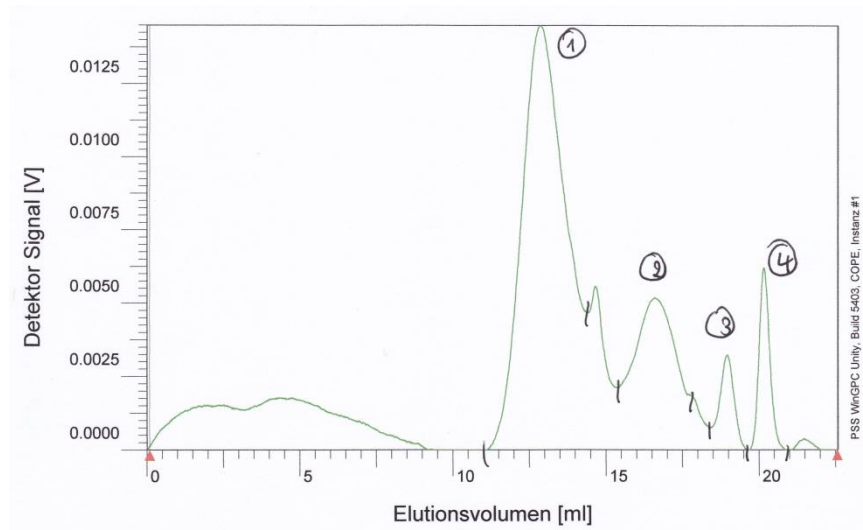
Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 187\,370\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 83\,040\text{ g/mol}$ ;  $PDI_1 = 2.26$

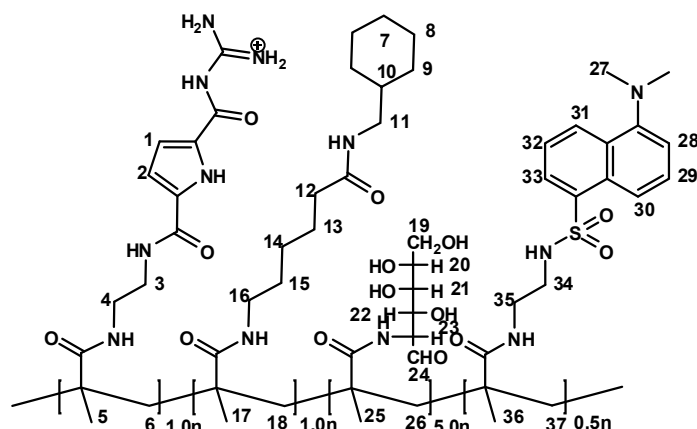
$\bar{M}_{w2} = 1\,236\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 840\text{ g/mol}$ ;  $PDI_2 = 1.47$

$\bar{M}_{w3} = 254\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 253\text{ g/mol}$ ;  $PDI_3 = 1.0$

$\bar{M}_{w4} = 171\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n4} = 170\text{ g/mol}$ ;  $PDI_4 = 1.0$



**Abb. 5.18:** GPC-Spektrum von Polymer 3.

**5.3.2.4 Polymer 4**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.82-2.39 (m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-25, H-26, H-36, H-37), 2.74-4.11 (m, H-3, H-4, H-11, H-16, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-27, H-34, H-35), 4.98-5.35 (m, H-24).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 335\,360 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 111\,450 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.0$

$\bar{M}_{w2} = 999 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 654 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.53$

$\bar{M}_{w3} = 173 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 173 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.0$

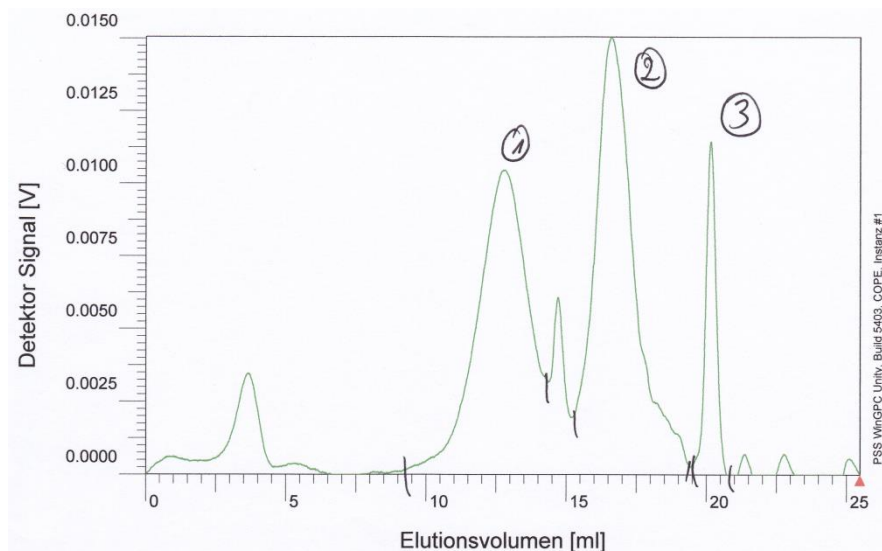
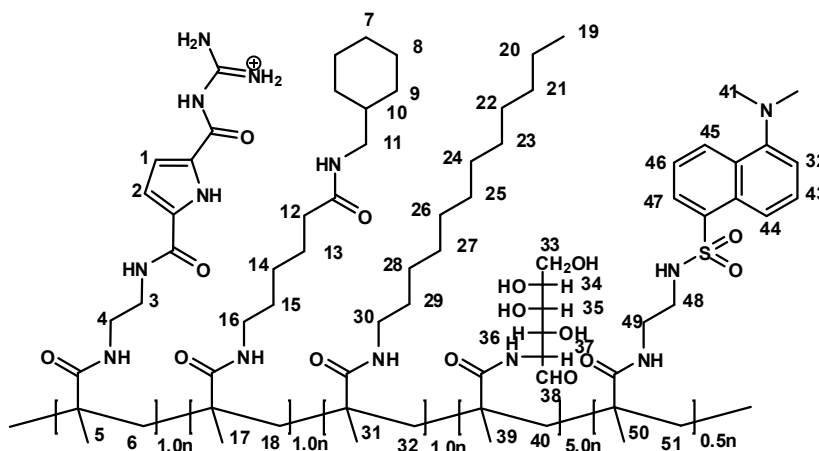


Abb. 5.19: GPC-Spektrum von Polymer 4.

### 5.3.2.5 Polymer 5

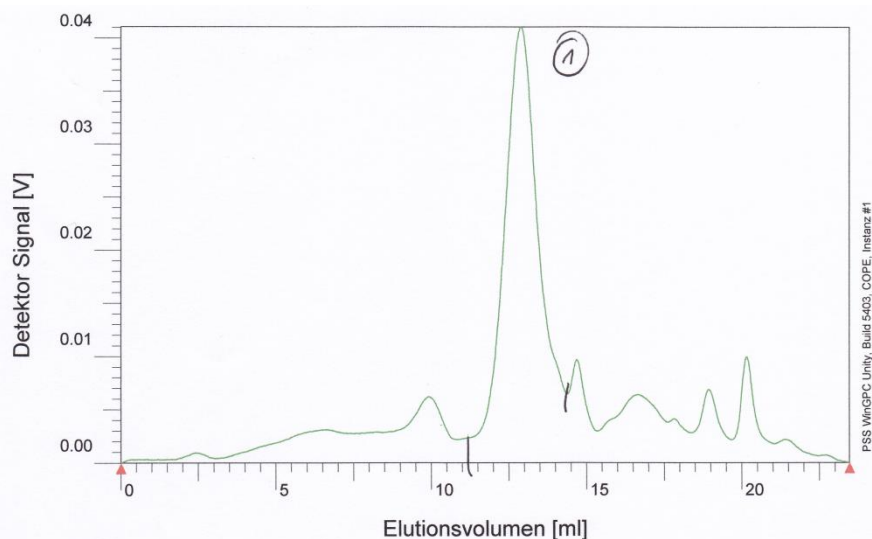
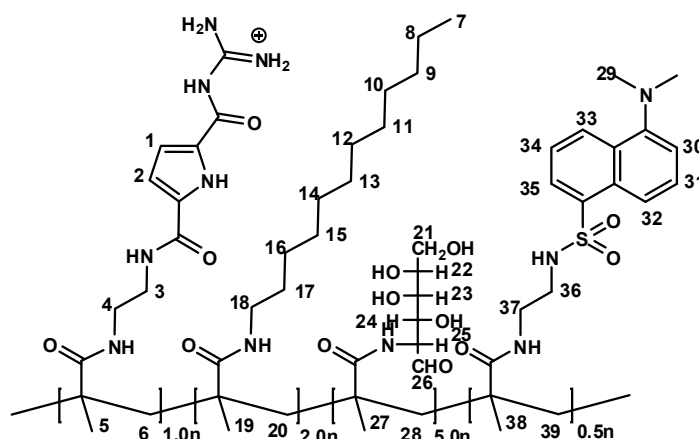


**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.82-2.39 (m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-39, H-40, H-50, H-51), 2.74-4.11 (m, H-3, H-4, H-11, H-16, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-27, H-48, H-49), 4.98-5.35 (m, H-38).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

 $\bar{M}_w = 217\,260\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 103\,780\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.1$ **Abb. 5.20:** GPC-Spektrum von Polymer 5.**5.3.2.6: Polymer 6**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.71-2.08 (m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-27, H-28, H-38, H-39), 2.67-4.01 (m, H-3, H-4, H-18, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-36, H-37), 4.91-5.24 (m, H-26).

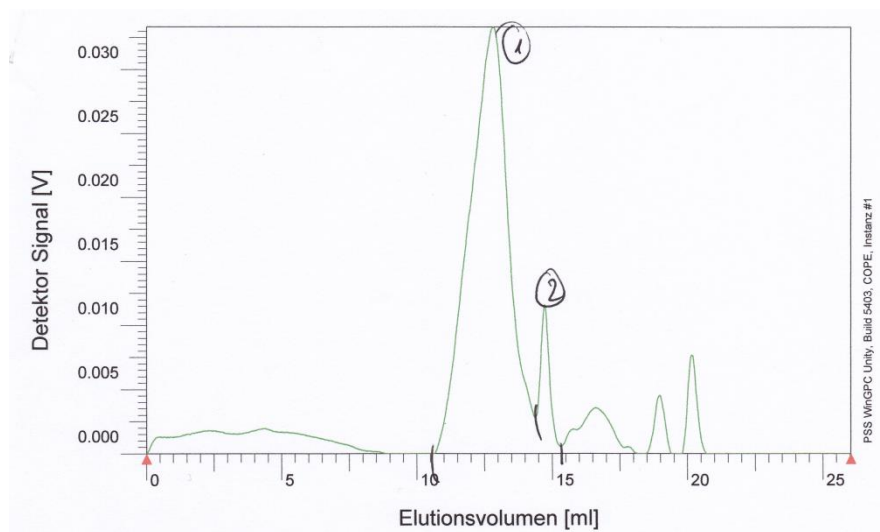
Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

### Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :

Pullulan – Standard:

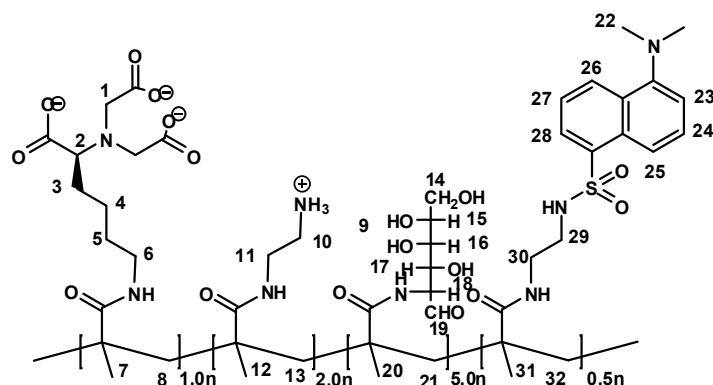
$\bar{M}_w = 310\,040\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 144\,870\text{ g/mol}$ ;  $PDI_1 = 2.1$

$\bar{M}_{w2} = 10\,533\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 9\,720\text{ g/mol}$ ;  $PDI_2 = 1.53$



**Abb. 5.21:** GPC-Spektrum von Polymer 6.



**5.3.2.7: Polymer 7**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.65 - 2.36 (m, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-11, H-12, H-13, H-20, H-21, H-31, H-32), 2.73 - 4.31 (m, H-1, H-2, H-6, H-9, H-10, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-22, H-29, H-30), 5.05 - 5.32 (m, H-19), 8.04 - 8.46 (m, H-25, H-26, H-28).

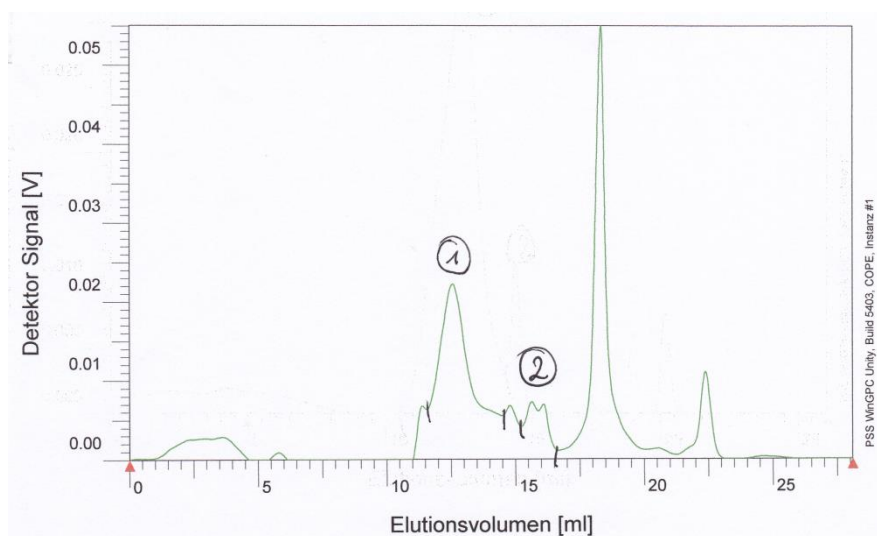
Auf Grund der Signalverbreiterung konnten die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers nicht unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

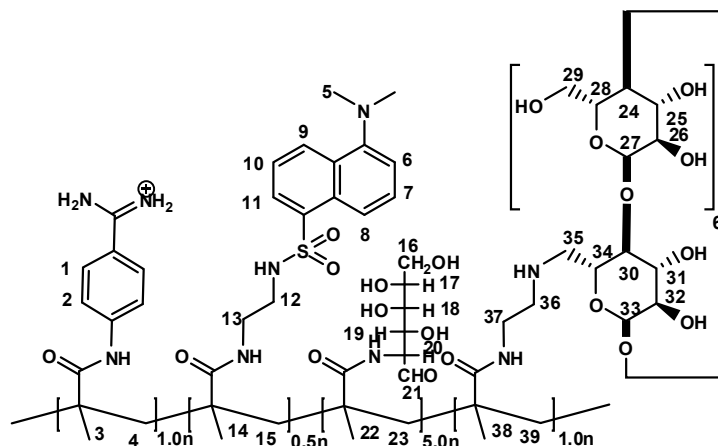
Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 127\,810\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 57\,755\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.21$

$\bar{M}_{w2} = 3\,652\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 2\,997\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.22$



**Abb. 5.22:** GPC-Spektrum von Polymer 7.

**5.3.2.8: Polymer 8**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.71 - 2.12 (m, H-3, H-4, H-14, H-15, H-22, H-23, H-38, H-39), 2.65 - 4.17 (m, H-5, H-12, H-13, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37), 5.02 - 5.22 (m, H-21), 7.33 – 8.61 (m, H-1, H-2, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 142\,650\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 83\,349\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.71$

$\bar{M}_{w2} = 1\,005\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 748\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.34$

$\bar{M}_{w3} = 247\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 245\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.0$

$\bar{M}_{w4} = 169\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n4} = 168\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_4 = 1.0$

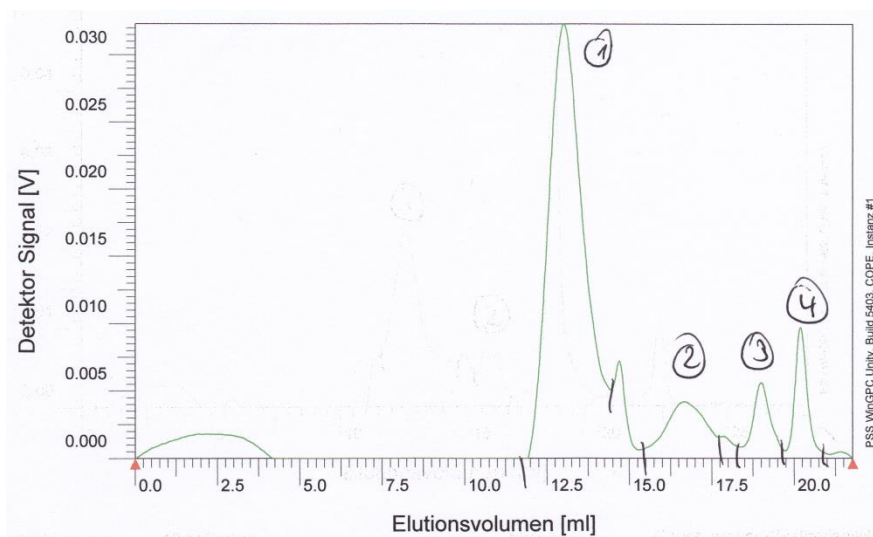
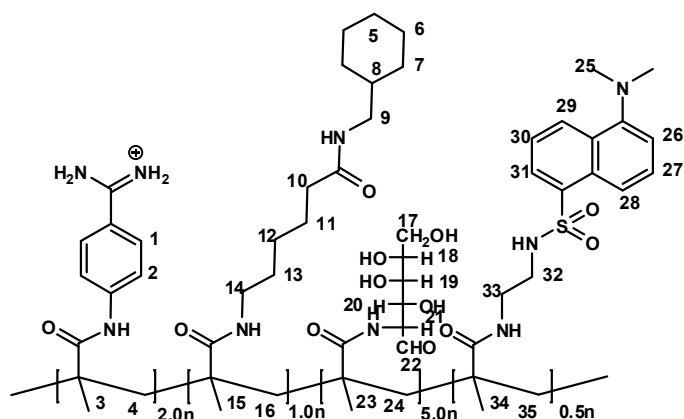


Abb. 5.23: GPC-Spektrum von Polymer 8.

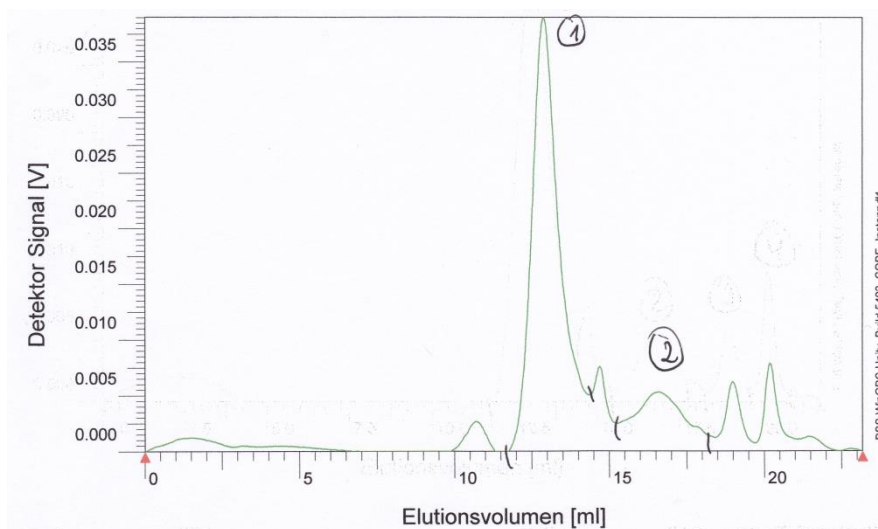
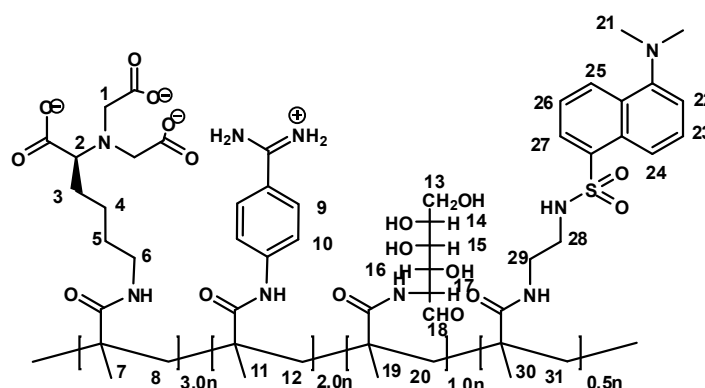
### 5.3.2.9: Polymer 9



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.65 - 2.33 (m, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13, H-15, H-16, H-23, H-24, H-34, H-35), 2.69 - 4.06 (m, H-9, H-14, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-25, H-32, H-33), 5.03 - 5.26 (m, H-22), 7.27 - 8.49 (m, H-1, H-2, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

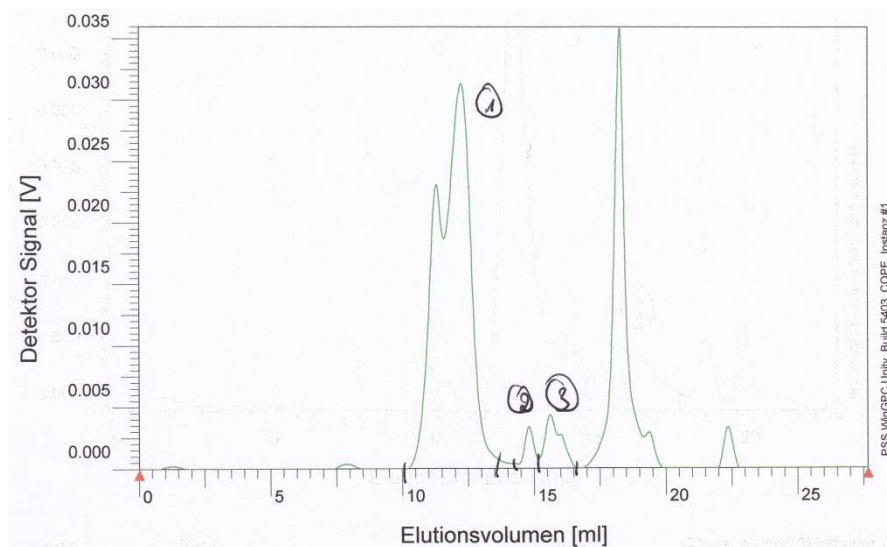
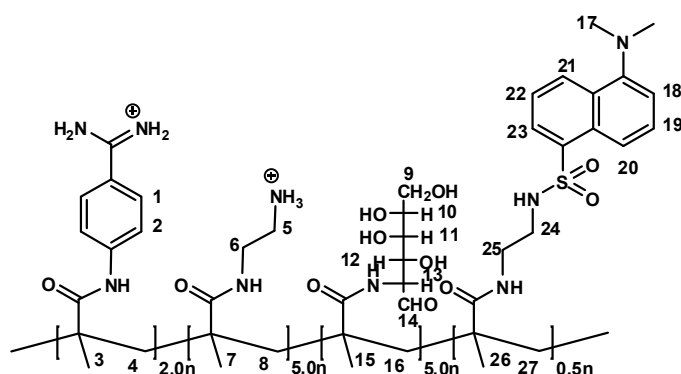
Pullulan – Standard:

 $\bar{M}_w = 161\,120\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 97\,658\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.65$  $\bar{M}_{w2} = 1\,206\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 727\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.66$ **Abb. 5.24:** GPC-Spektrum von Polymer 9.**5.3.2.10: Polymer 10**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.63-2.34 (m, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-12, H-13, H-19, H-20, H-30, H-31), 2.71-4.29 (m, H-1, H-2, H-6, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-21, H-28, H-29), 5.03-5.30 (m, H-18), 7.31-8.44 (m, H-9, H-10, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

 $\bar{M}_w = 648\,560 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 215\,150 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.01$  $\bar{M}_{w2} = 11\,761 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 11\,468 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.03$  $\bar{M}_{w3} = 382 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 324 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.18$ **Abb. 5.25:** GPC-Spektrum von Polymer 10.**5.3.2.11: Polymer 11**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.70 - 2.26 (m, H-3, H-4, H-7, H-8, H-15, H-16, H-26, H-27), 2.58 - 4.03 (m, H-5, H-6, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-17, H-24, H-

25), 5.07 - 5.28 (m, H-14), 7.34 - 8.59 (m, H-1, H-2, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23).

### Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :

Polyethylenglycol – Standard:

$\bar{M}_w = 3\,219\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 3\,091\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.04$

$\bar{M}_{w2} = 359\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 265\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.35$

$\bar{M}_{w3} = 29\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 29\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.0$

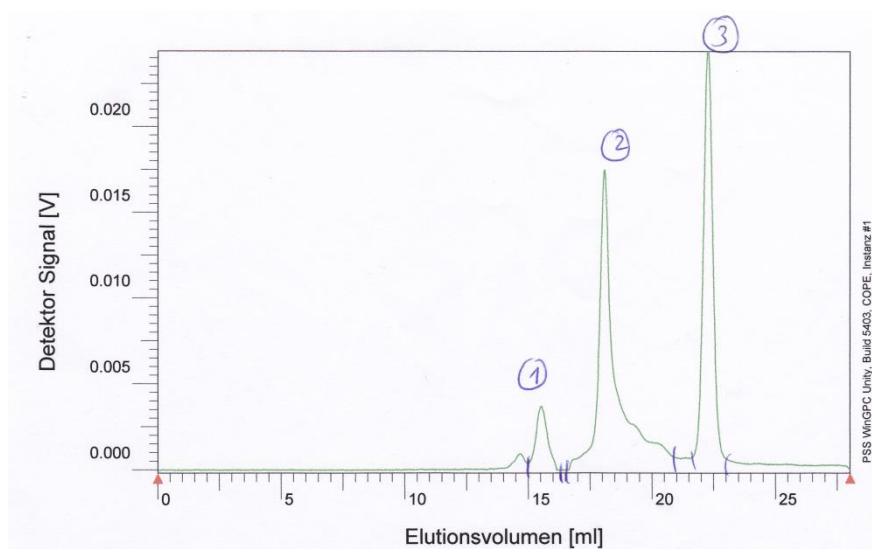
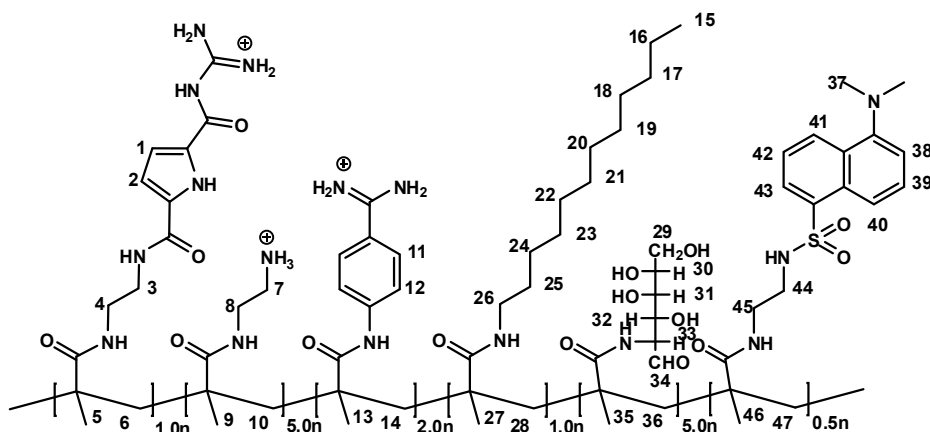


Abb. 5.26: GPC-Spektrum von Polymer 11.

### 5.3.2.12: Polymer 12



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.68 - 2.32 (m, H-5, H-6, H-9, H-10, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-27, H-28, H-35, H-36, H-46, H-47), 2.67 - 4.08 (m, H-3, H-4, H-7, H-8, H-26, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-37, H-30, H-31), 5.01 - 5.32 (m, H-34), 7.32-8.57 (m, H-11, H-12).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

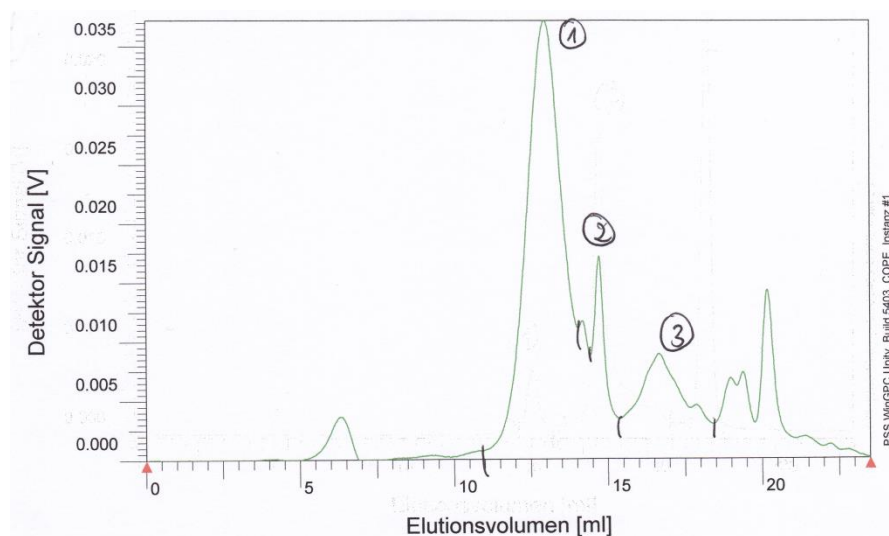
### Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :

Pullulan – Standard:

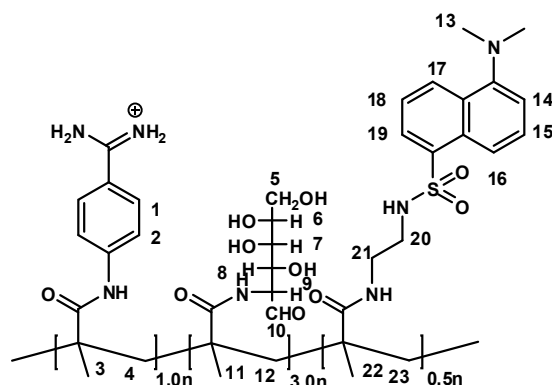
$\bar{M}_w = 206\,400\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 116\,370\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.77$

$\bar{M}_{w2} = 10\,103\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 9\,025\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.12$

$\bar{M}_{w3} = 1\,031\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 659\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.56$



**Abb. 5.27:** GPC-Spektrum von Polymer 12.

**5.3.2.13: Polymer 13**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.66 - 2.31 (m, H-3, H-4, H-10, H-12, H-13, H-22, H-23), 2.63 – 3.99 (m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-13, H-20, H-21), 4.89 - 5.27 (m, H-10), 7.33 - 8.54 (m, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

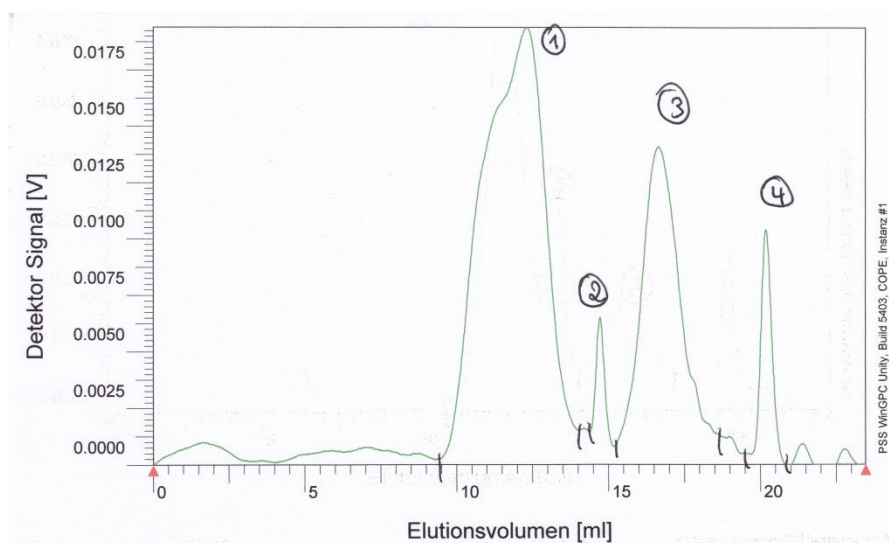
Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 755\,340\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 324\,030\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.33$

$\bar{M}_{w2} = 10\,704\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 9\,992\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.07$

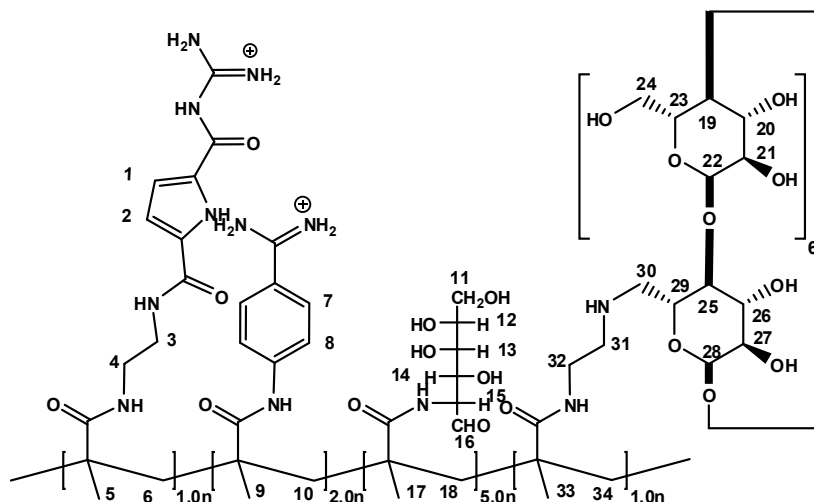
$\bar{M}_{w3} = 961\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 684\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.4$

$\bar{M}_{w4} = 170\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n4} = 170\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_4 = 1.0$



**Abb. 5.28:** GPC-Spektrum von Polymer 13.



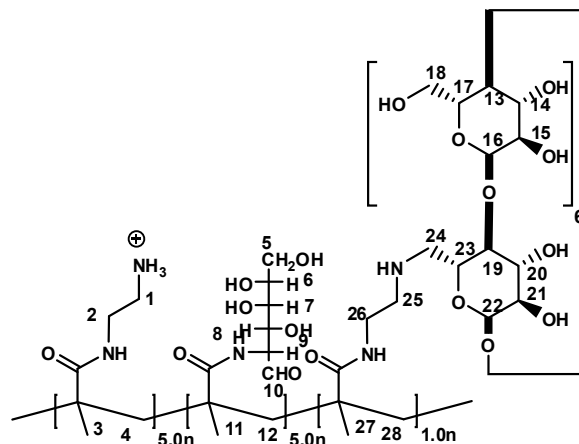
**5.3.2.14: Polymer 14**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.68-2.09 (m, H-5, H-6, H-9, H-10, H-17, H-18, H-33, H-34), 2.62-4.14 (m, H-3, H-4, H-14, H-15, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32), 4.99-5.19 (m, H-16).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

**5.3.2.15: Polymer 15**

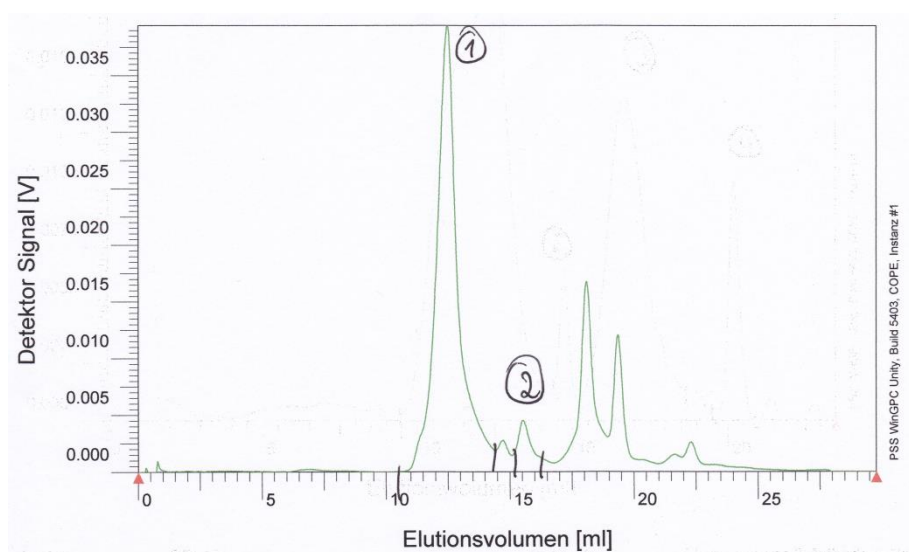
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.69 - 2.10 (m, H-3, H-4, H-11, H-12, H-27, H-28), 2.63 - 4.15 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26), 5.00 - 5.21 (m, H-10).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

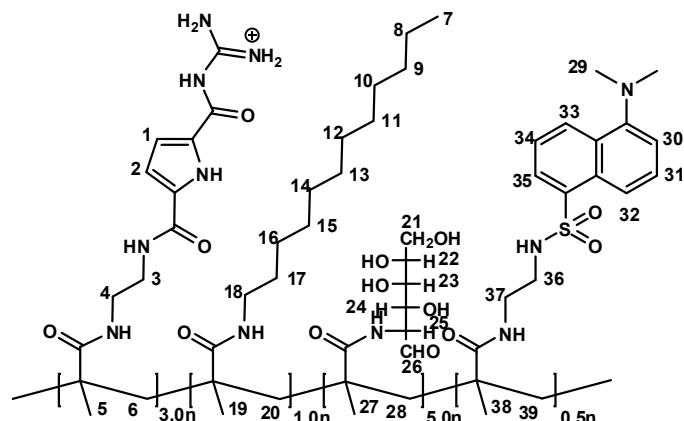
$\bar{M}_w = 172\,900$  g/mol,  $\bar{M}_n = 84\,057$  g/mol;  $\text{PDI}_1 = 2.06$

$\bar{M}_{w2} = 4\,954$  g/mol,  $\bar{M}_{n2} = 4\,411$  g/mol;  $\text{PDI}_2 = 1.12$



**Abb. 5.29:** GPC-Spektrum von Polymer 15.

**5.3.2.16: Polymer 16**



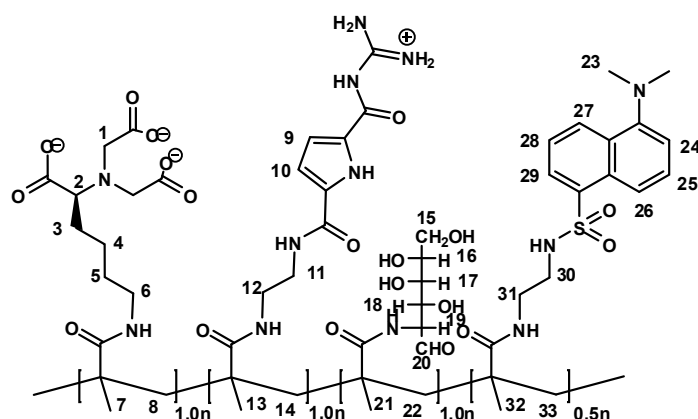
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.73 - 2.10 (m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-27, H-28, H-38, H-39), 2.69 - 4.04 (m, H-3, H-4, H-18, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-36, H-37), 4.94 - 5.25 (m, H-26).

Auf Grund der Signalverbreitung konnten weder die aromatischen Protonen des Dansyl-Monomers noch die des CBS-Monomers unterschieden werden.

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

### **5.3.2.17: Polymer 17**



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.67 - 2.38 (m, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-11, H-13, H-14, H-21, H-22, H-32, H-33), 2.75 - 4.34 (m, H-1, H-2, H-6, H-11, H-12, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-23, H-30, H-31), 5.07 - 5.34 (m, H-19), 8.06 - 8.49 (m, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29).

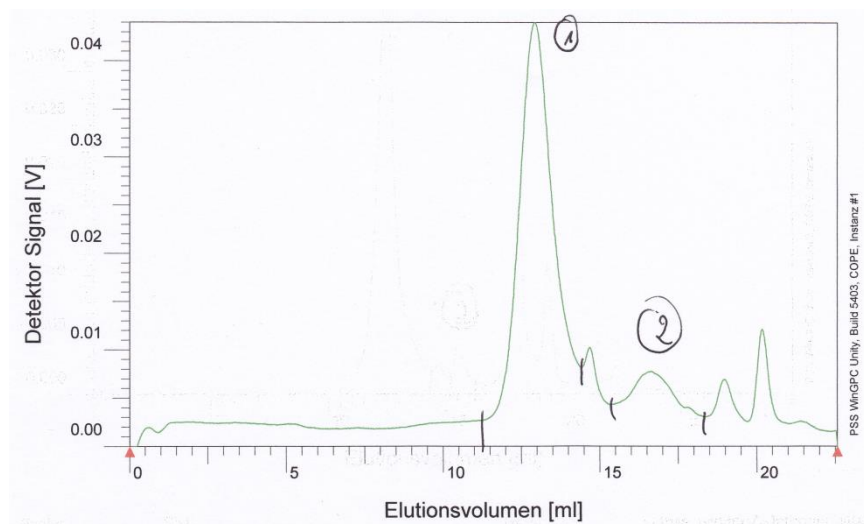
Auf Grund der Signalverbreitung konnten die aromatischen Protonen des CBS-Monomers nicht unterschieden werden.

### Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :

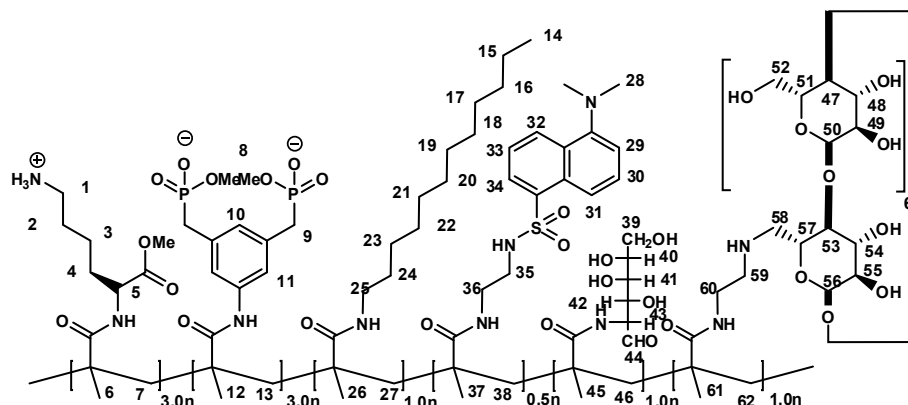
Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 188\,600\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 92\,911\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.03$

$\bar{M}_{w2} = 1\,094\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 672\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.63$



**Abb. 5.30:** GPC-Spektrum von Polymer 17.

**5.3.2.18: Polymer 18**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.68-2.09 (m, H-6, H-7, H-12, H-13, H-26, H-27, H-37, H-38, H-45, H-46, H-61, H-62), 2.62-4.14 (m, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-8, H-9, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-28, H-35, H-36, H-39, H-40, H-41, H-42, H-43, H-47, H-48, H-49, H-50, H-51, H-52, H-53, H-54, H-55, H-56, H-57, H-58, H-59, H-60), 4.99-5.19 (m, H-44), 6.88 – 7.75 (m, H-10, H-11, H-29, H-30, H-33), 7.90 – 8.52 (m, H-31, H-32, H-34).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Polyethylenglycol – Standard:

$\bar{M}_w = 114\,190 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 68\,459 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.67$

$\bar{M}_{w2} = 421 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 413 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.02$

$\bar{M}_{w3} = 28 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 27 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.0$

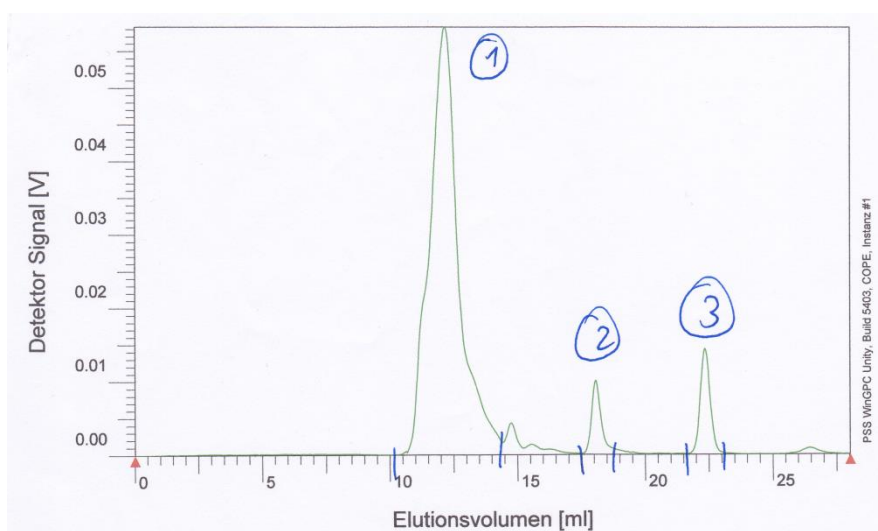
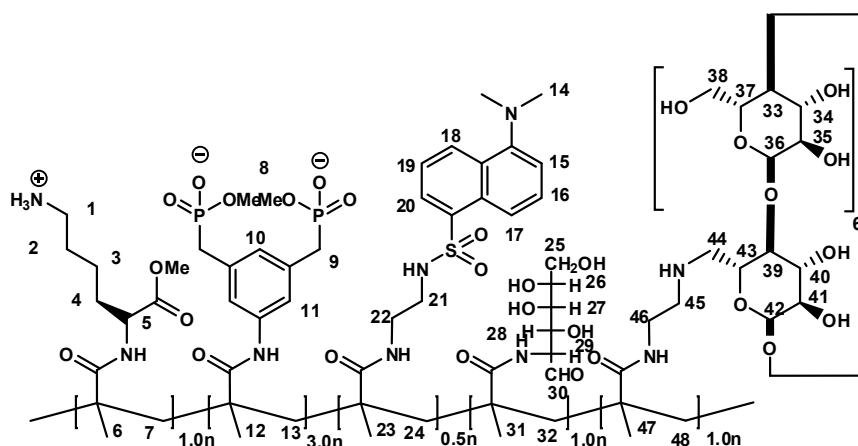


Abb. 5.31: GPC-Spektrum von Polymer 18.

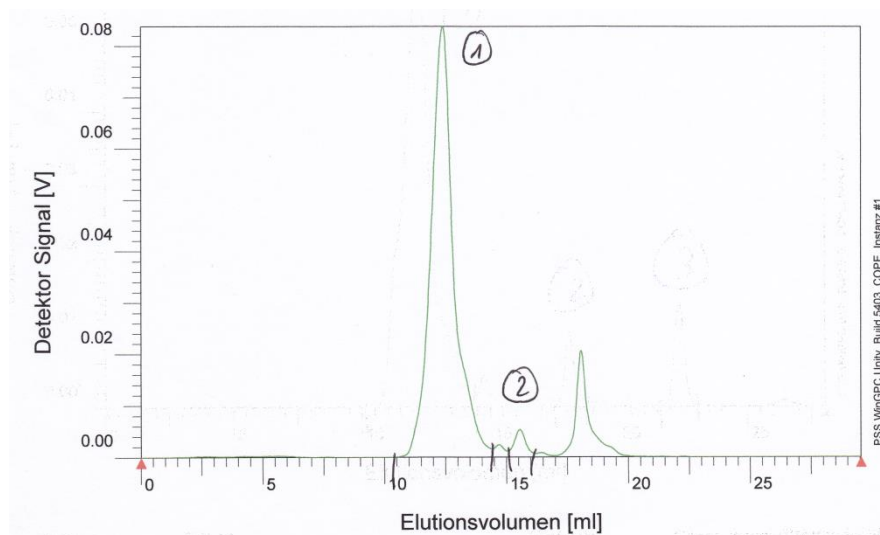
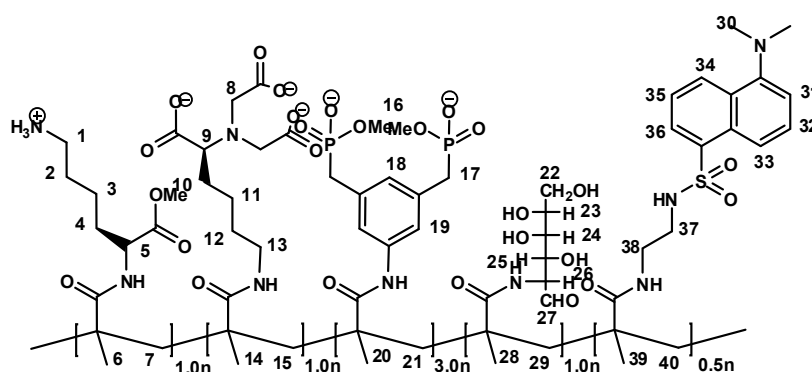
### 5.3.2.19: Polymer 19



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.71 - 2.12 (m, H-2, H-3, H-4, H-6, H-7, H-12, H-13, H-23, H-24, H-31, H-32, H-47, H-48), 2.65 - 4.19 (m, H-1, H-5, H-8, H-9, H-14, H-21, H-22, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41, H-42, H-43, H-44, H-45, H-46), 5.03 - 5.22 (m, H-30), 6.91 - 7.78 (m, H-10, H-11, H-29, H-30, H-33), 7.93 - 8.55 (m, H-31, H-32, H-34).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

 $\bar{M}_w = 202\,360\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 99\,659\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.03$  $\bar{M}_{w2} = 4\,869\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 4\,278\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.14$ **Abb. 5.32:** GPC-Spektrum von Polymer 19.**5.3.2.20: Polymer 20**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.60 - 2.34 (m, H-2, H-3, H-4, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15, H-20, H-21, H-28, H-29, H-39, H-40), 2.58 - 4.04 (m, H-1, H-5, H-8, H-9, H-13, H-16, H-17, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-30, H-37, H-38), 5.05 -

5.28 (m, H-27), 6.90 - 7.77 (m, H-18, H-19, H-31, H-32, H-35), 7.92 - 8.55 (m, H-33, H-34, H-35).

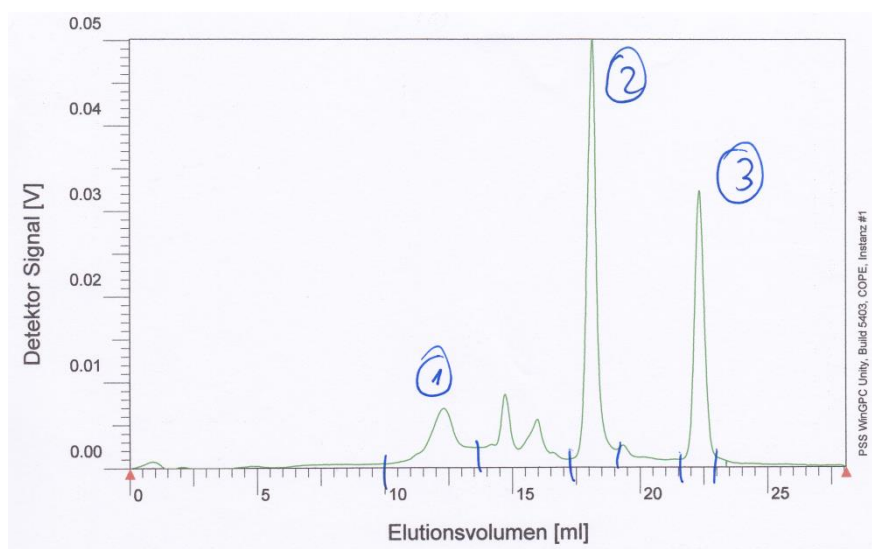
### Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :

Polyethylenglycol – Standard:

$\bar{M}_w = 125\,530\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 63\,379\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.98$

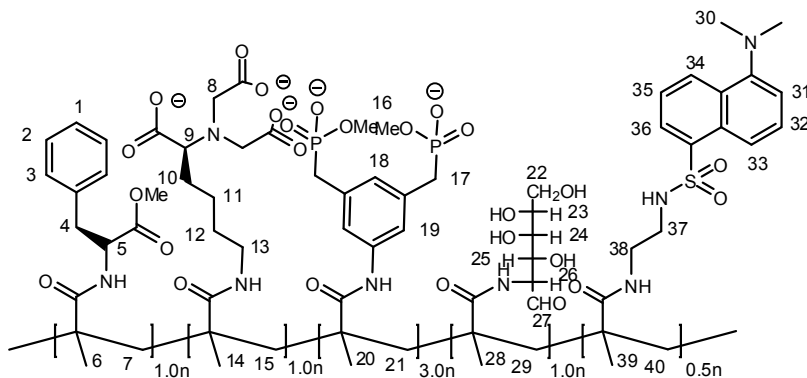
$\bar{M}_{w2} = 417\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 402\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.4$

$\bar{M}_{w3} = 28\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 27\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.0$



**Abb. 5.33:** GPC-Spektrum von Polymer 20.

### 5.3.2.21: Polymer 21





**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.60 - 2.34 (m, H-4, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15, H-20, H-21, H-28, H-29, H-39, H-40), 2.58 - 4.04 (m, H-1, H-5, H-8, H-9, H-13, H-16, H-17, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-30, H-37, H-38), 5.05 - 5.28 (m, H-27), 6.90 - 7.77 (m, H-3, H-18, H-19, H-31, H-32, H-35), 7.92 - 8.55 (m, H-1, H-2, H-33, H-34, H-35).

### Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :

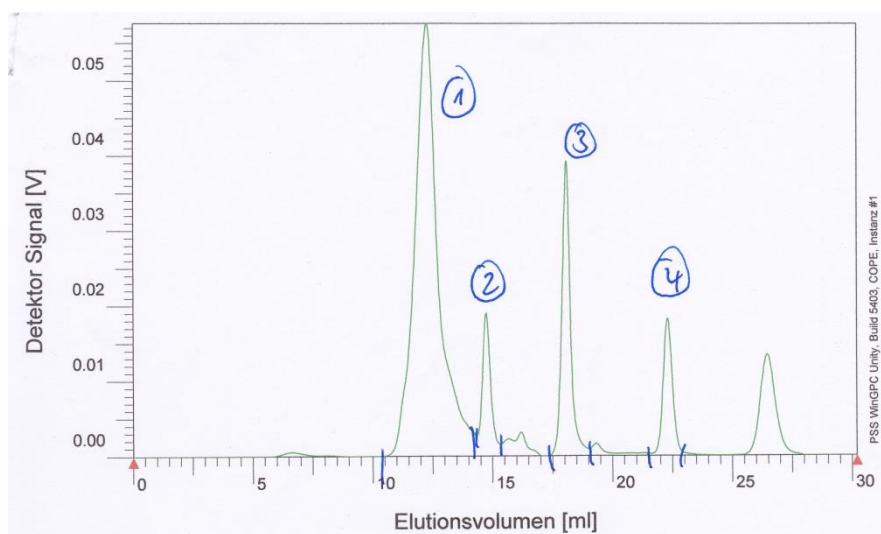
Polyethylenglycol – Standard:

$\bar{M}_w = 95\,685\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 61\,751\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.55$

$\bar{M}_{w2} = 6\,580\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 6\,367\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.03$

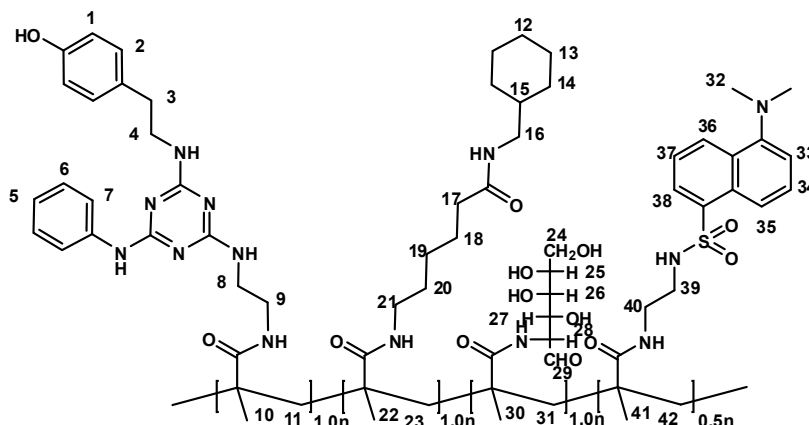
$\bar{M}_{w3} = 423\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 413\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 1.02$

$\bar{M}_{w4} = 29\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n4} = 28\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_4 = 1.0$



**Abb. 5.34:** GPC-Spektrum von Polymer 21.

#### **5.3.2.22: Polymer 22**

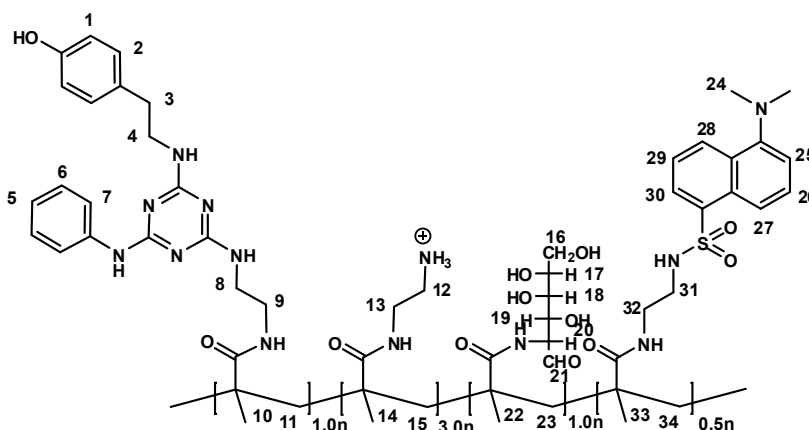


**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.59-2.33 (m, H-3, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-19, H-20, H-22, H-23, H-30, H-31, H-41, H-42), 2.57-4.03 (m, H-4, H-8, H-9, H-16, H-21, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-32, H-39, H-40), 5.04-5.27 (m, H-29), 6.67 - 7.76 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-33, H-34, H-36), 7.91-8.53 (m, H-35, H-36, H-38).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

### **5.3.2.23: Polymer 23**

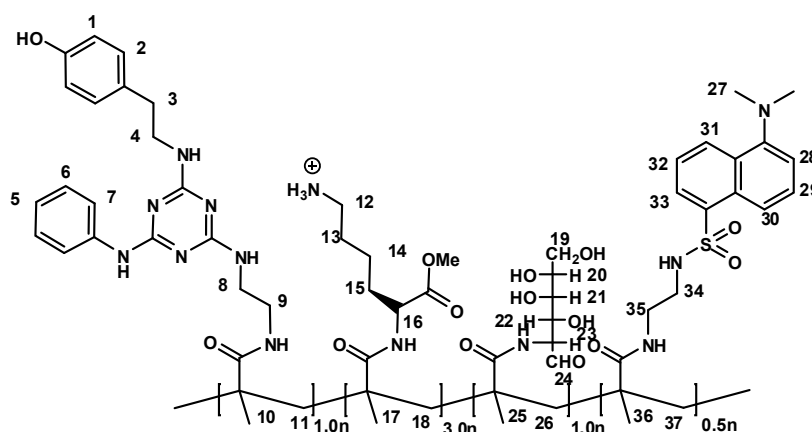


**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.61 - 2.35 (m, H-3, H-10, H-11, H-14, H-15, H-22, H-23, H-33, H-34), 2.59 - 4.05 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-24, H-31, H-32), 5.06 - 5.29 (m, H-21), 6.69 - 7.79 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-25, H-26, H-29), 7.93 - 8.56 (m, H-27, H-28, H-30).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

### 5.3.2.24: Polymer 24

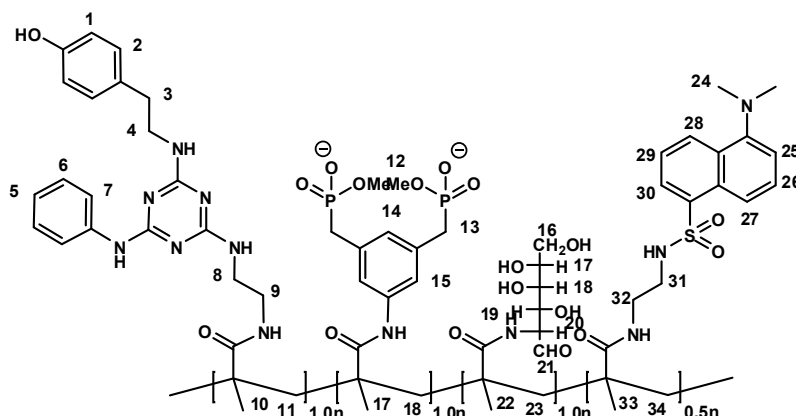


**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.61 - 2.35 (m, H-3, H-10, H-11, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-25, H-26, H-36, H-37), 2.59 - 4.05 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-16, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-27, H-34, H-35), 5.06 - 5.29 (m, H-24), 6.69 - 7.79 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-28, H-29, H-32), 7.93 - 8.56 (m, H-30, H-31, H-33).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

### **5.3.2.25: Polymer 25**

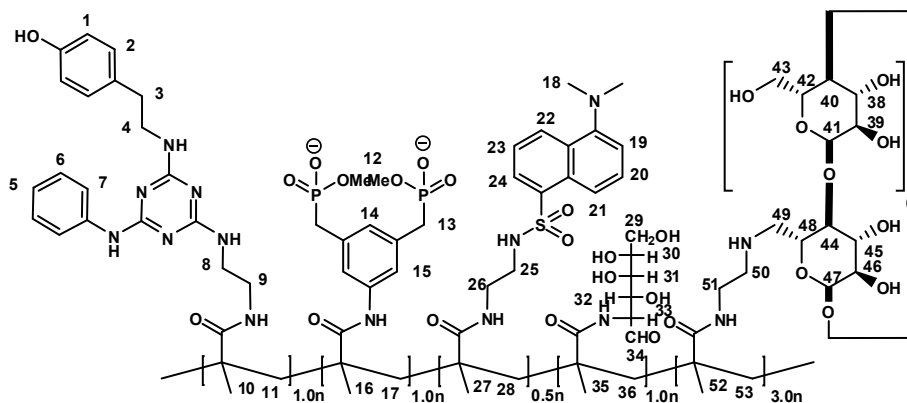


**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.61 - 2.35 (m, H-3, H-10, H-11, H-17, H-18, H-22, H-23, H-33, H-34), 2.59 - 4.05 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-24, H-31, H-32), 5.06 - 5.29 (m, H-21), 6.69 - 7.79 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-14, H-15, H-25, H-26, H-29), 7.93 - 8.56 (m, H-27, H-28, H-30).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

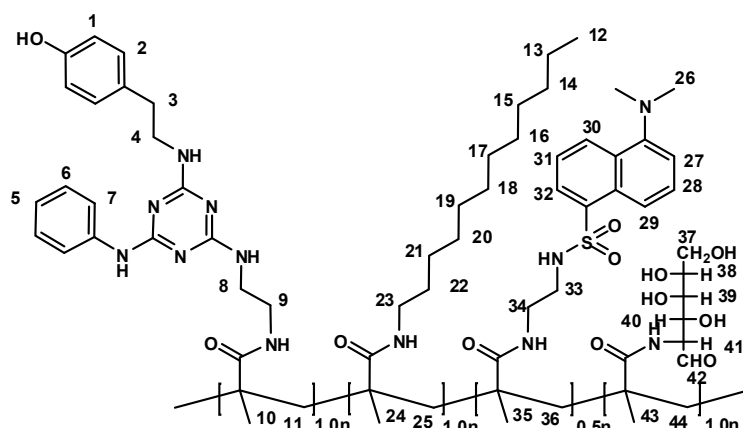
**5.3.2.26: Polymer 26**



**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

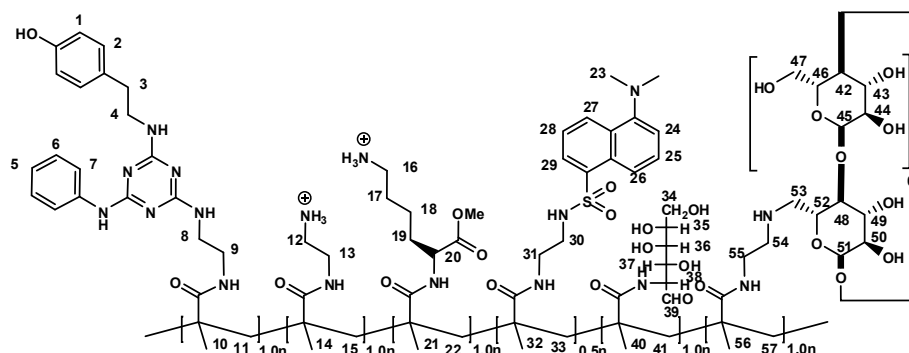
Nicht löslich!

#### 5.3.2.27: Polymer 27



**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

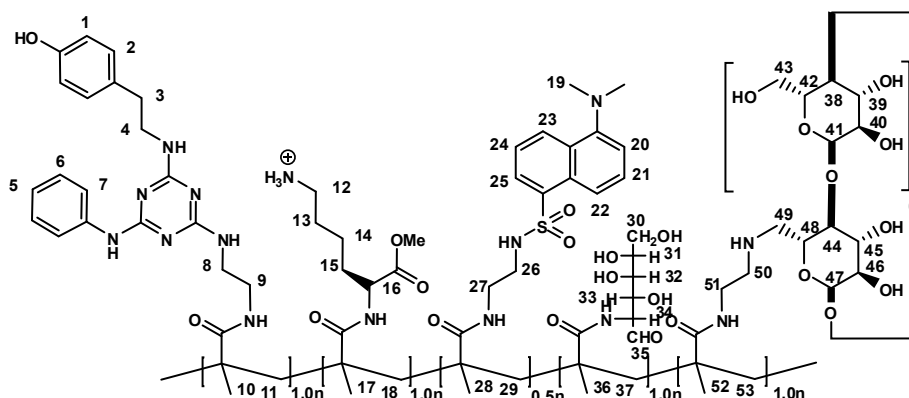
Nicht löslich!

**5.3.2.28: Polymer 28**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.64 - 2.38 (m, H-3, H-10, H-11, H-14, H-15, H-17, H-18, H-19, H-21, H-22, H-32, H-33, H-40, H-41, H-56, H-57), 2.62 - 4.07 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-16, H-20, H-23, H-30, H-31, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-42, H-43, H-44, H-45, H-46, H-47, H-48, H-49, H-50, H-51, H-52, H-53, H-54, H-55), 4.99 - 5.21 (m, H-39), 6.67 - 7.78 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-24, H-25, H-28), 7.95 - 8.57 (m, H-26, H-27, H-29).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

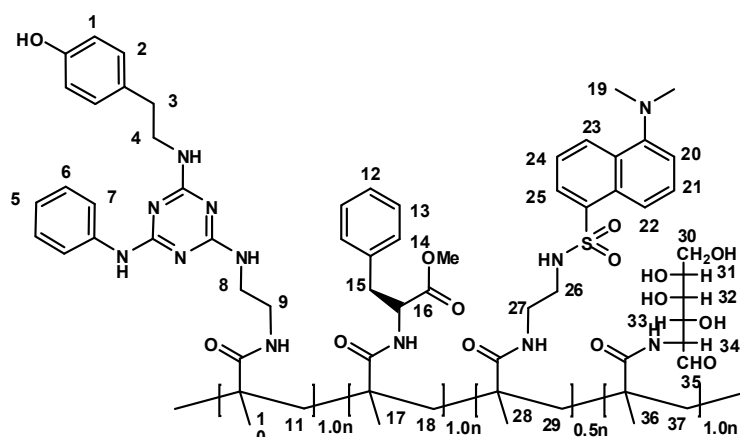
**5.3.2.29: Polymer 29**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.67 - 2.41 (m, H-3, H-10, H-11, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-28, H-29, H-36, H-37, H-52, H-53), 2.65 - 4.10 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-16, H-19, H-26, H-27, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-38, H-39, H-40, H-41, H-42, H-43, H-44, H-45, H-46, H-47, H-48, H-49, H-50, H-51), 5.02 - 5.25 (m, H-35), 6.68 - 7.80 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-20, H-21, H-24), 7.99 - 8.61 (m, H-22, H-23, H-25).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

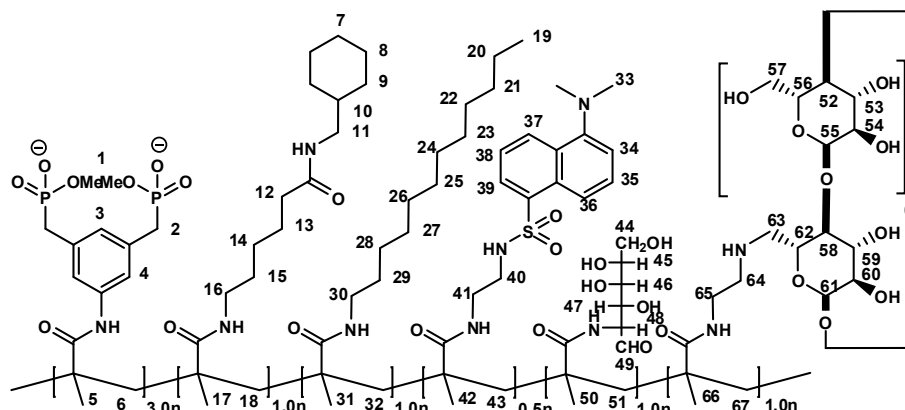
### **5.3.2.30: Polymer 30**



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.70 - 2.44 (m, H-3, H-10, H-11, H-15, H-17, H-18, H-28, H-29, H-36, H-37), 2.68 - 4.13 (m, H-4, H-8, H-9, H-16, H-19, H-26, H-27, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34), 5.05 - 5.28 (m, H-35), 6.68 - 7.80 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-14, H-20, H-21, H-24), 8.00 - 8.62 (m, H-12, H-13, H-22, H-23, H-25).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Nicht löslich!

**5.3.2.31: Polymer 31**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.71 - 2.12 (m, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-24, H-26, H-27, H-28, H-29, H-31, H-32, H-42, H-43, H-50, H-51, H-66, H-67), 2.65 - 4.19 (m, H-1, H-2, H-16, H-30, H-33, H-40, H-41, H-44, H-45, H-46, H-47, H-48, H-52, H-53, H-54, H-55, H-56, H-57, H-58, H-59, H-60, H-61, H-62, H-63, H-64, H-65), 5.03 - 5.22 (m, H-49), 6.91 – 7.78 (m, H-3, H-4, H-34, H-35, H-38), 7.93 – 8.55 (m, H-36, H-37, H-39).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 136\,080\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 73\,642\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.85$

$\bar{M}_{w2} = 4\,758\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 4\,137\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.15$



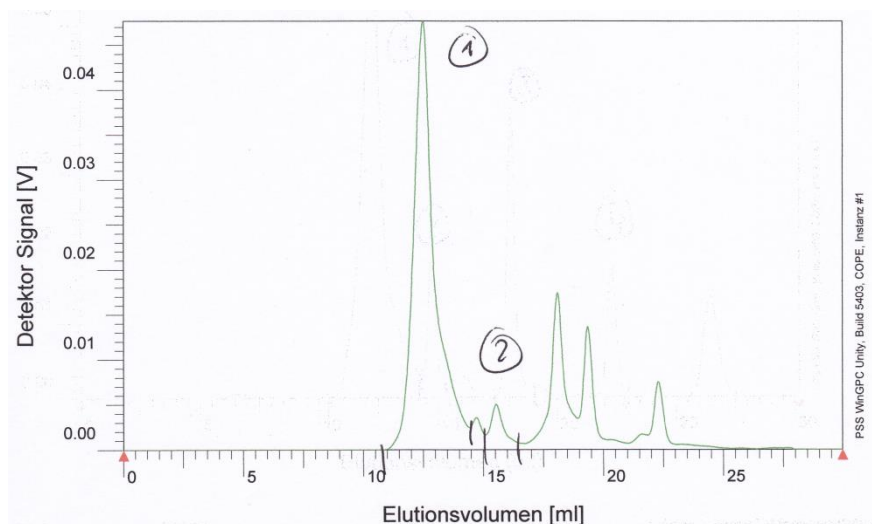
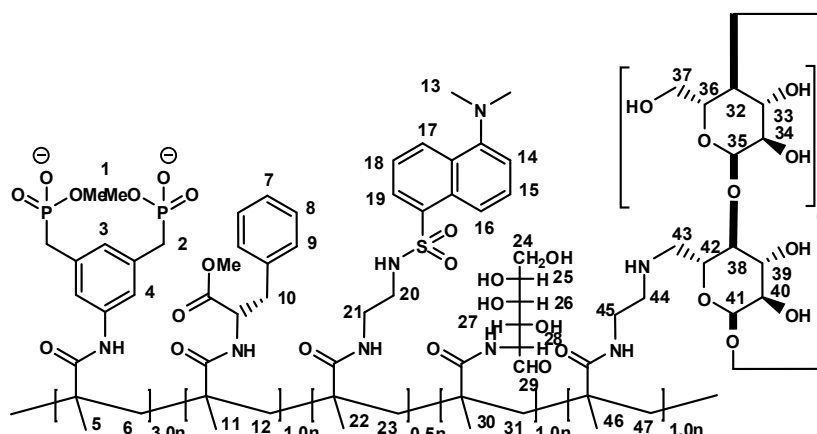


Abb. 5.35: GPC-Spektrum von Polymer 31.

### 5.3.2.32: Polymer 32



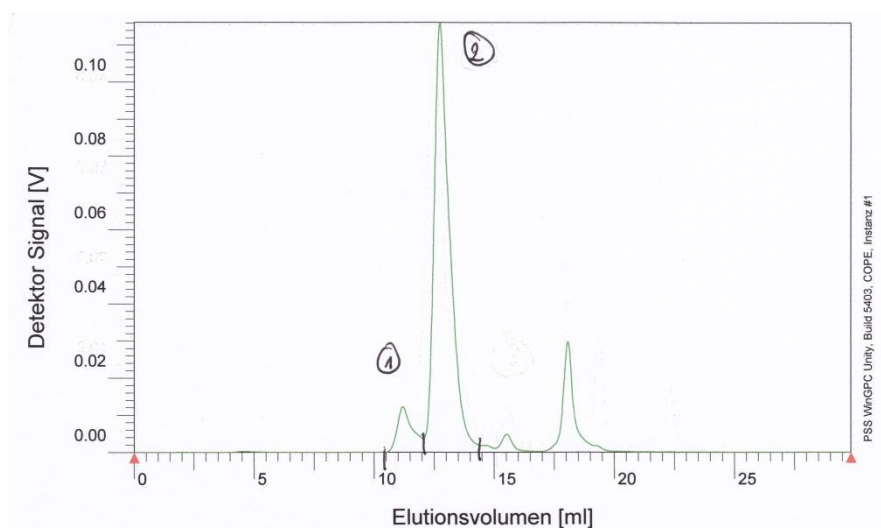
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.76 - 2.18 (m, H-5, H-6, H-10, H-11, H-12, H-22, H-23, H-30, H-31, H-46, H-47), 2.69 - 4.23 (m, H-1, H-2, H-13, H-20, H-21, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41, H-42, H-43, H-44, H-45), 5.08 - 5.26 (m, H-29), 6.97 - 7.82 (m, H-3, H-4, H-14, H-15, H-18), 7.97 - 8.59 (m, H-16, H-17, H-19).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

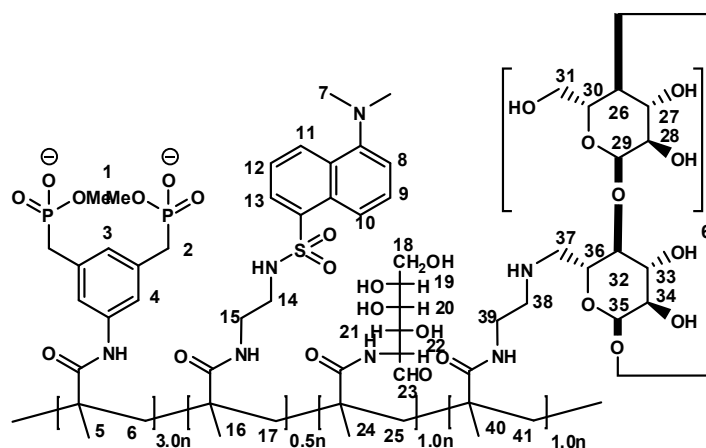
$\bar{M}_w = 1\,222\,700\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 781\,290\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.56$

$\bar{M}_{w2} = 75\,301\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 59\,584\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.23$



**Abb. 5.36:** GPC-Spektrum von Polymer 32.

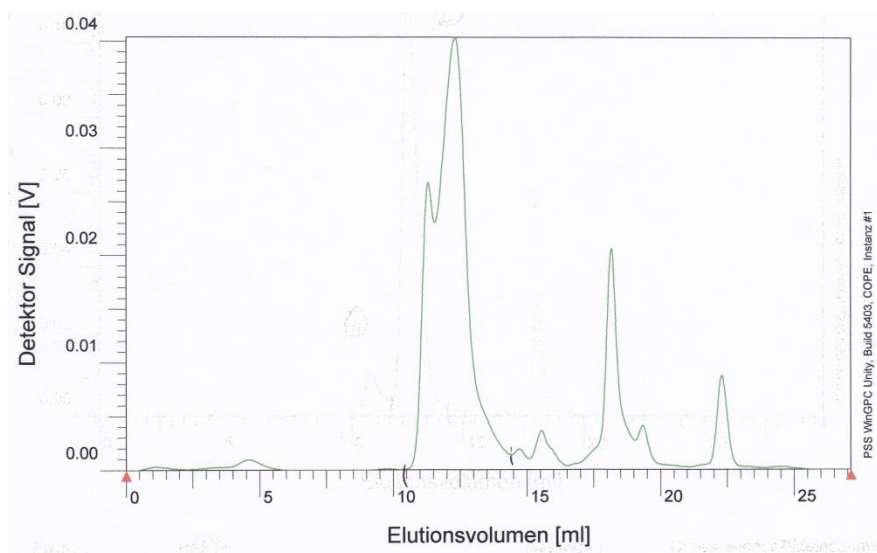
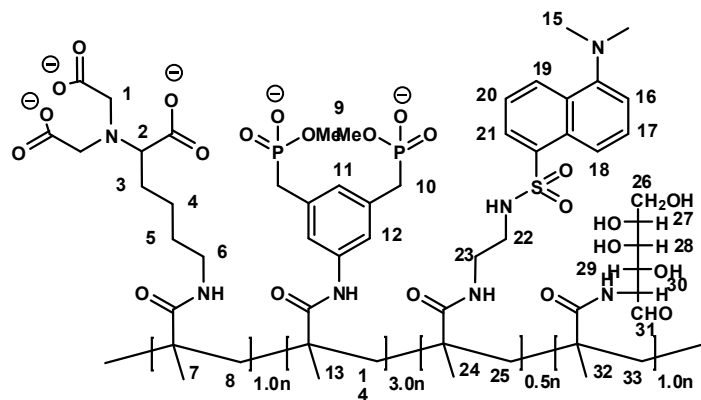
### 5.3.2.33: Polymer 33 (Best Binder)



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.76 - 2.18 (m, H-5, H-6, H-16, H-17, H-24, H-25, H-40, H-41), 2.69 - 4.23 (m, H-1, H-2, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39), 5.08 - 5.26 (m, H-23), 6.97 - 7.82 (m, H-3, H-4, H-8, H-9, H-12), 7.97 - 8.59 (m, H-10, H-11, H-13).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

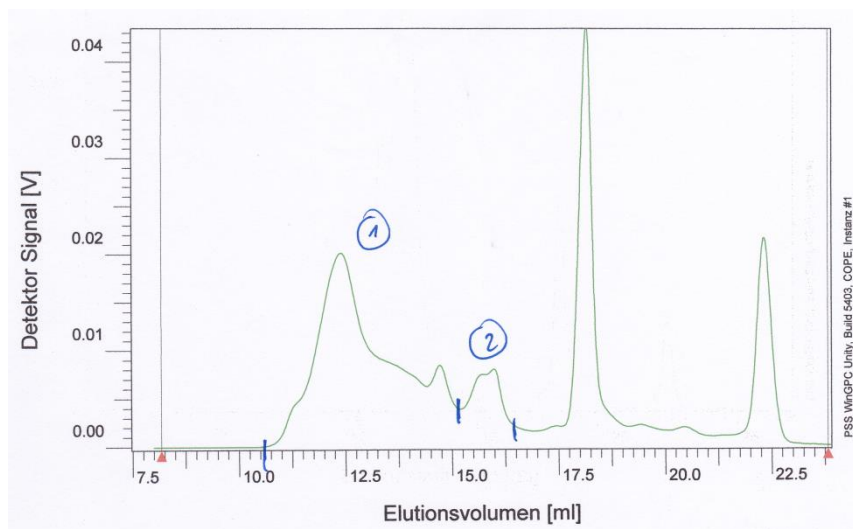
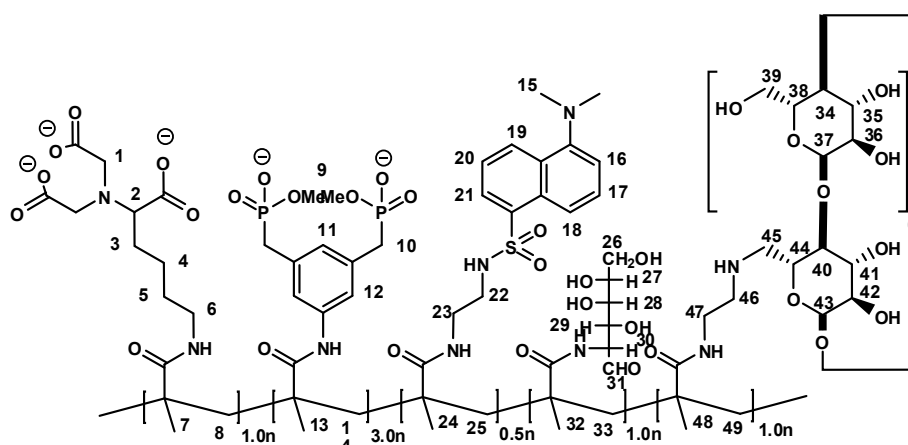
Polyethylenglycol – Standard:

 $\bar{M}_w = 83\,470\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 26\,331\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.17$ **Abb. 5.37:** GPC-Spektrum von Polymer 33.**5.3.2.34: Polymer 34 (Best Binder)**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.78 - 2.20 (m, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-13, H-14, H-24, H-25, H-32, H-33), 2.71 - 4.25 (m, H-1, H-2, H-6, H-9, H-10, H-15, H-22, H-23, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30), 5.09 - 5.28 (m, H-31), 6.99 – 7.84 (m, H-11, H12, H-16, H-17, H-20), 7.99 – 8.88 (m, H-18, H-19, H-21).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Polyethylenclycol – Standard:

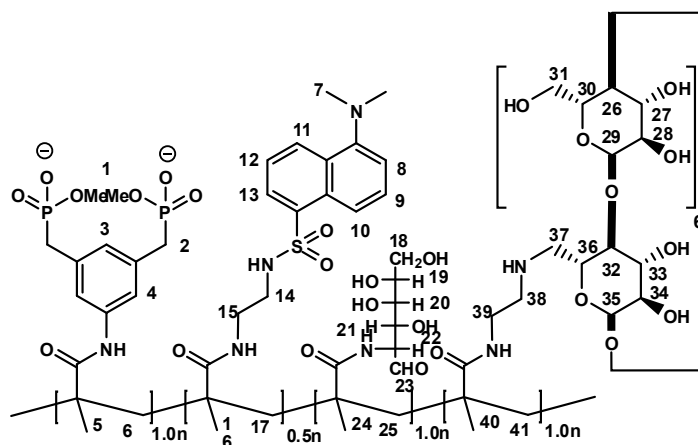
 $\bar{M}_w = 76\,753\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 24\,366\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.15$  $\bar{M}_{w2} = 1\,723\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 1\,594\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.08$ **Abb. 5.38:** GPC-Spektrum von Polymer 34.**5.3.2.35: Polymer 35**

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.78 - 2.20 (m, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-13, H-14, H-24, H-25, H-32, H-33, H-48, H-49), 2.71 - 4.25 (m, H-1, H-2, H-6, H-9, H-10, H-15, H-22, H-23, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39,

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

$$\bar{M}_w = 598\,620 \text{ g/mol}, \bar{M}_n = 193\,200 \text{ g/mol}; \text{PDI}_1 = 3.10$$
$$\bar{M}_{w2} = 11\,935 \text{ g/mol}, \bar{M}_{n2} = 11\,477 \text{ g/mol}; \text{PDI}_2 = 1.04$$


#### **5.3.2.36: Polymer 36 – 40**



**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.76 - 2.18 (m, H-5, H-6, H-16, H-17, H-24, H-25, H-40, H-41), 2.69 - 4.23 (m, H-1, H-2, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39), 5.08 - 5.26 (m, H-23), 6.97 - 7.82 (m, H-3, H-4, H-8, H-9, H-12), 7.97 - 8.59 (m, H-10, H-11, H-13).

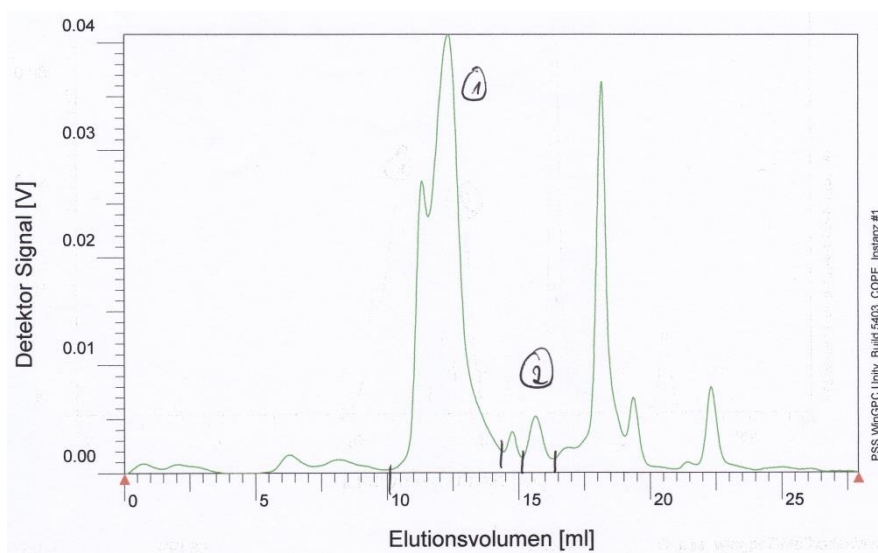
### **Polymer 36 (5 mol% AIBN)**

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 448\,030\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 121\,930\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.67$

$\bar{M}_{w2} = 4\,271\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 3\,674\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.16$



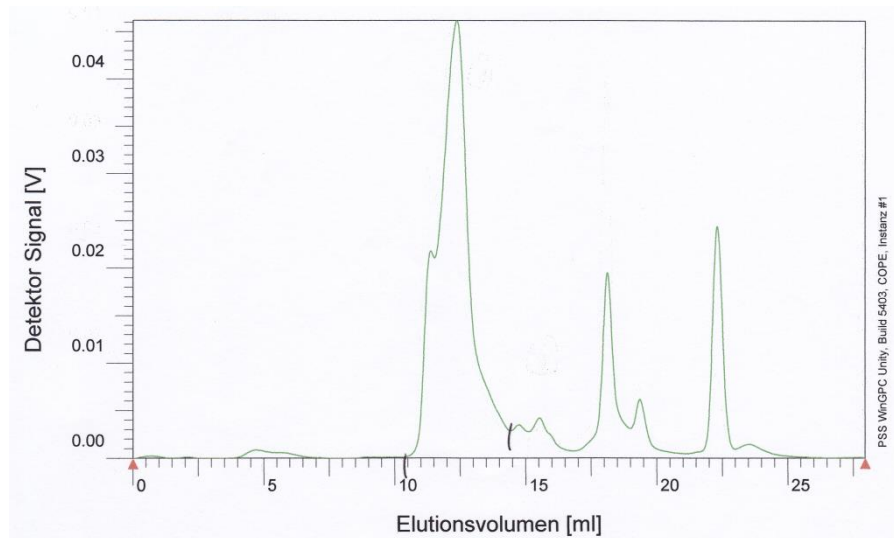
**Abb. 5.40:** GPC-Spektrum von Polymer 36.

### **Polymer 37 (8 mol% AIBN)**

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 337\,080\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 104\,450\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.22$



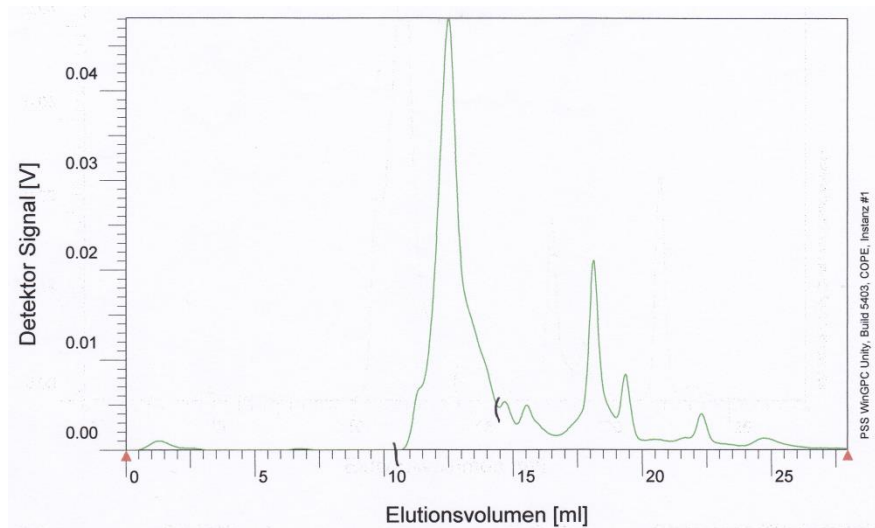
**Abb. 5.41:** GPC-Spektrum von Polymer 37.

### **Polymer 38 (10 mol% AIBN)**

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 182\,410\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 67\,597\text{ g/mol}$ ;  $PDI_1 = 2.70$



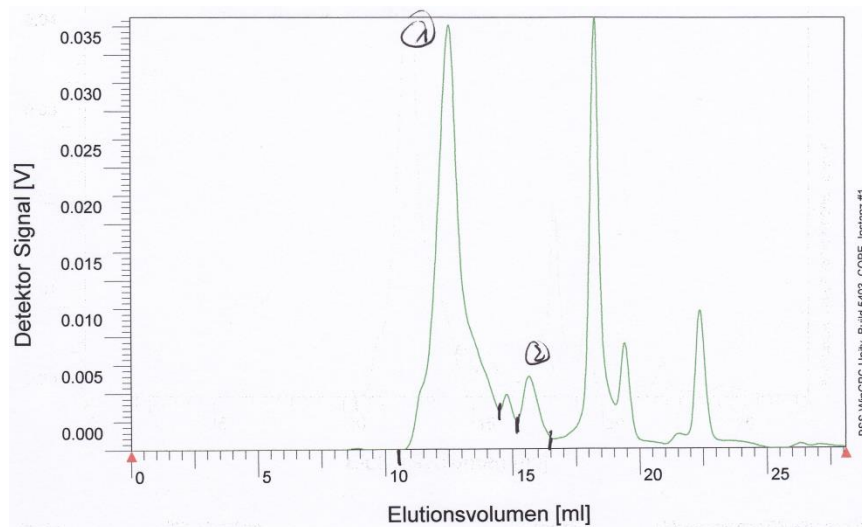
**Abb. 5.42:** GPC-Spektrum von Polymer 38.

**Polymer 39 (15 mol% AIBN)****Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 174\,190$  g/mol,  $\bar{M}_n = 68\,667$  g/mol;  $PDI_1 = 2.54$

$\bar{M}_{w2} = 3\,924$  g/mol,  $\bar{M}_{n2} = 3\,208$  g/mol;  $PDI_2 = 1.22$



**Abb. 5.43:**GPC-Spektrum von Polymer 39.

**Polymer P40.5 (20 mol% AIBN)****Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 162\,900$  g/mol,  $\bar{M}_n = 67\,737$  g/mol;  $PDI_1 = 2.40$



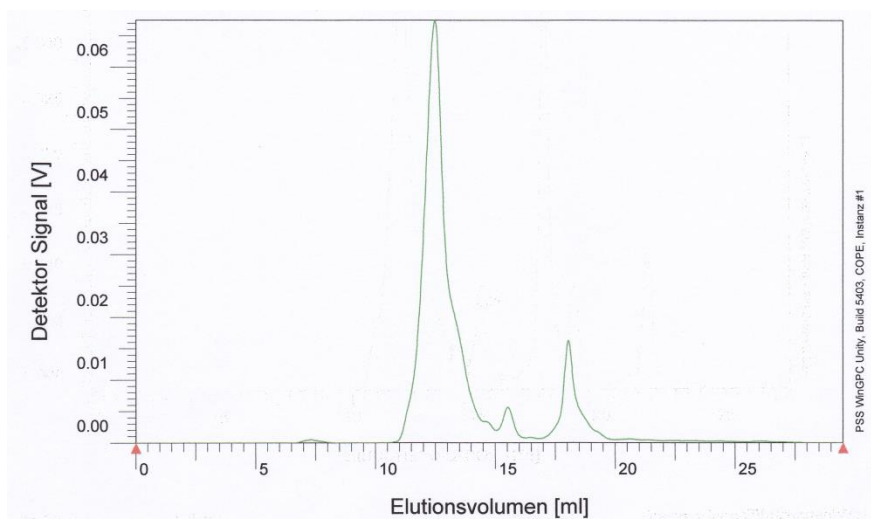
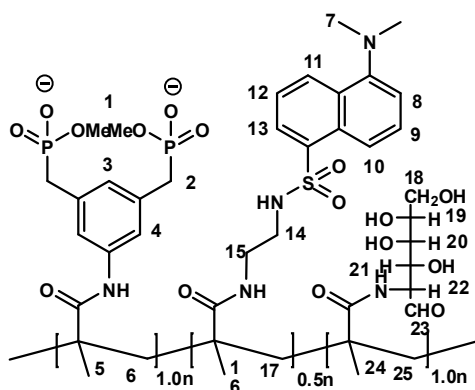


Abb. 5.44: GPC-Spektrum von Polymer P40.5.

### 5.3.2.37: Polymer 41

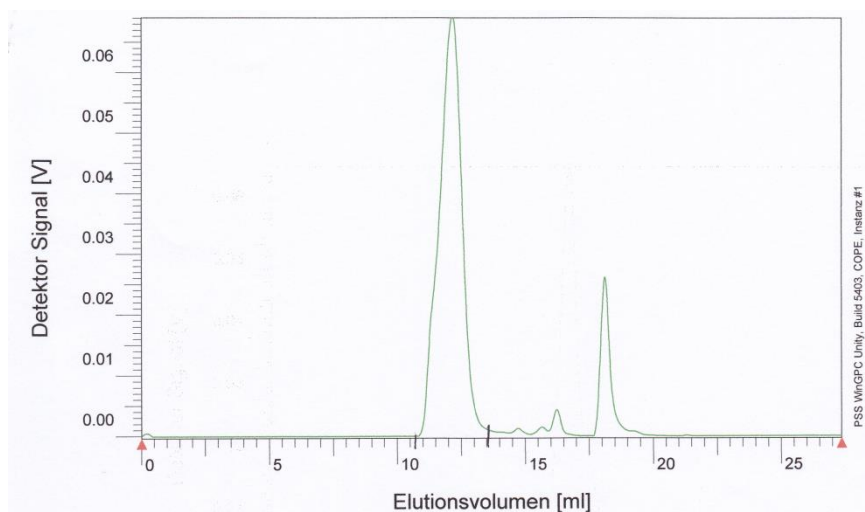


**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.66 - 2.28 (m, H-5, H-6, H-16, H-17, H-24, H-25), 2.54 - 4.16 (m, H-1, H-2, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22), 5.03 - 5.22 (m, H-23), 6.95 - 7.72 (m, H-3, H-4, H-8, H-9, H-12), 7.92 - 8.49 (m, H-10, H-11, H-13).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

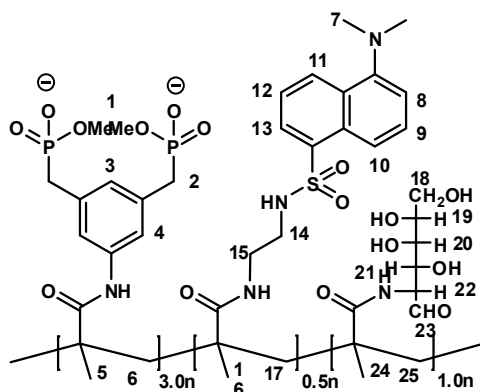
Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 331\,290 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 191\,290 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 1.73$



**Abb. 5.45:** GPC-Spektrum von Polymer 41.

### **5.3.1.38: Polymer 42**



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.69 - 2.31 (m, H-5, H-6, H-16, H-17, H-24, H-25), 2.55 - 4.17 (m, H-1, H-2, H-7, H-14, H-15, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22), 5.03 - 5.23 (m, H-23), 6.96 - 7.72 (m, H-3, H-4, H-8, H-9, H-12), 7.95 - 8.51 (m, H-10, H-11, H-13).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 284\,990$  g/mol,  $\bar{M}_n = 172\,860$  g/mol;  $PDI_1 = 1.65$

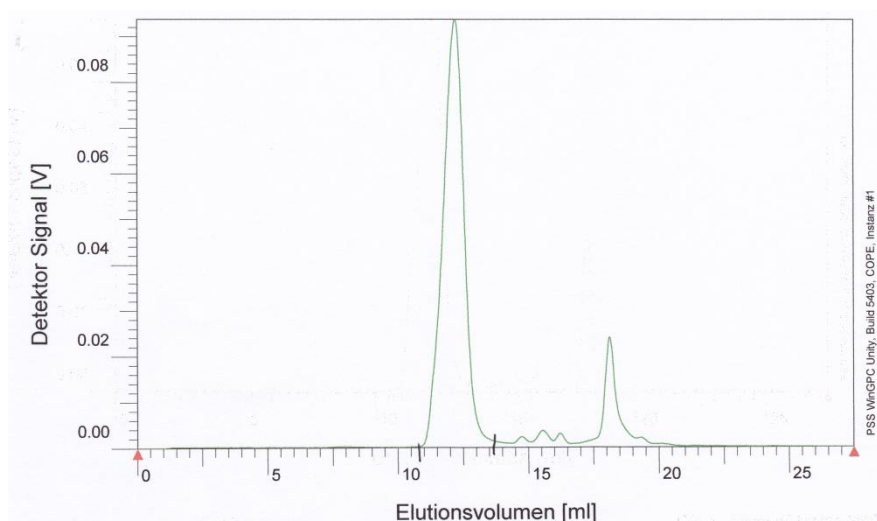
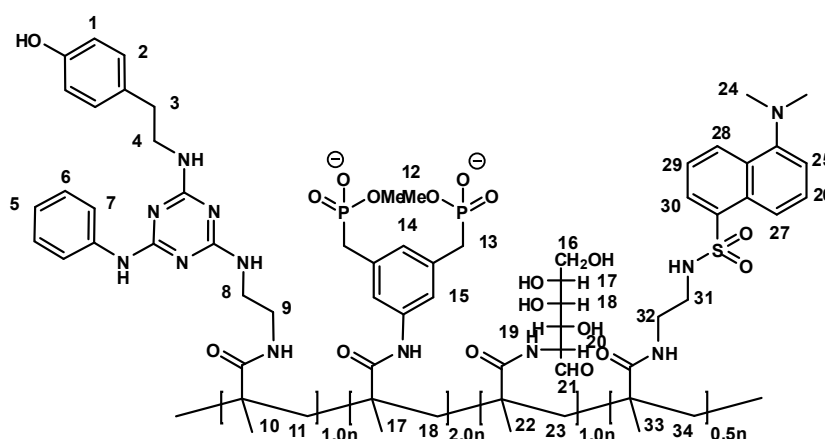


Abb. 5.46: GPC-Spektrum von Polymer 42.

### 5.3.2.39: Polymer 43



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.61 - 2.35 (m, H-3, H-10, H-11, H-17, H-18, H-22, H-23, H-33, H-34), 2.59 - 4.05 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-24, H-31, H-32), 5.06 - 5.29 (m, H-21), 6.69 - 7.79 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-14, H-15, H-25, H-26, H-29), 7.93 - 8.56 (m, H-27, H-28, H-30).

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 172\,720\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 85\,707\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.02$

$\bar{M}_{w2} = 11\,664\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 11\,279\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.03$

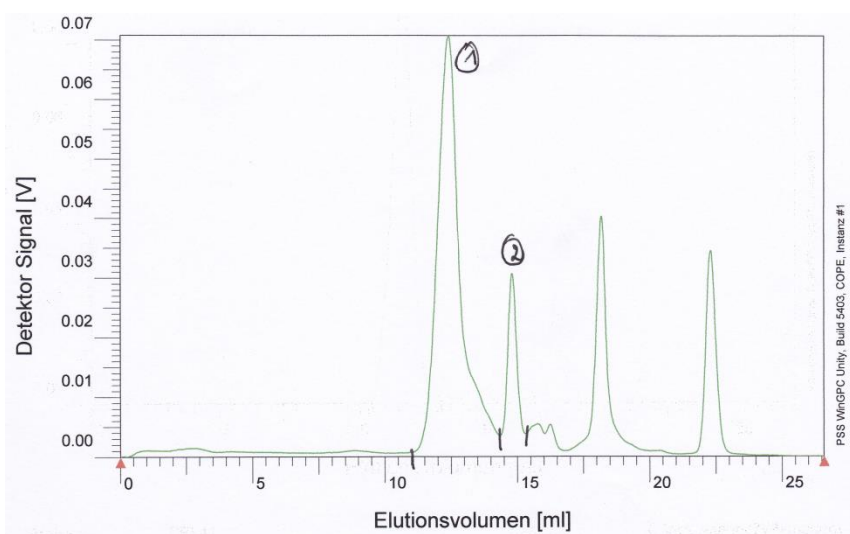
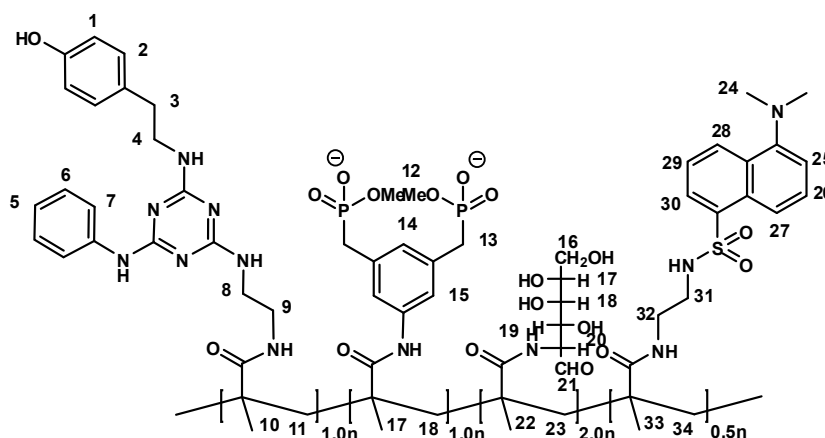


Abb. 5.47: GPC-Spektrum von Polymer 43.

### 5.3.2.40: Polymer 44



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.71 - 2.25 (m, H-3, H-10, H-11, H-17, H-18, H-22, H-23, H-33, H-34), 2.59 - 4.02 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-24, H-31, H-32), 5.16 - 5.27 (m, H-21), 6.70 - 7.82 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-14, H-15, H-25, H-26, H-29), 7.99 - 8.58 (m, H-27, H-28, H-30).

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

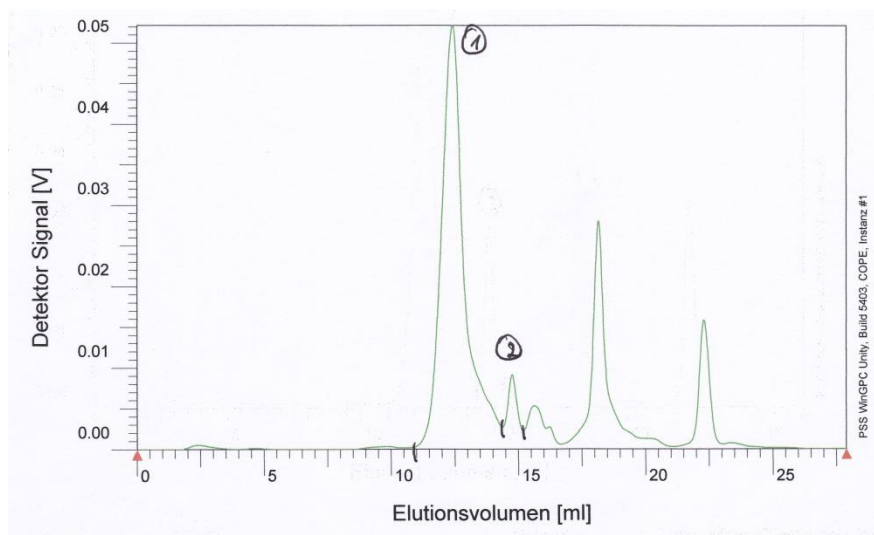
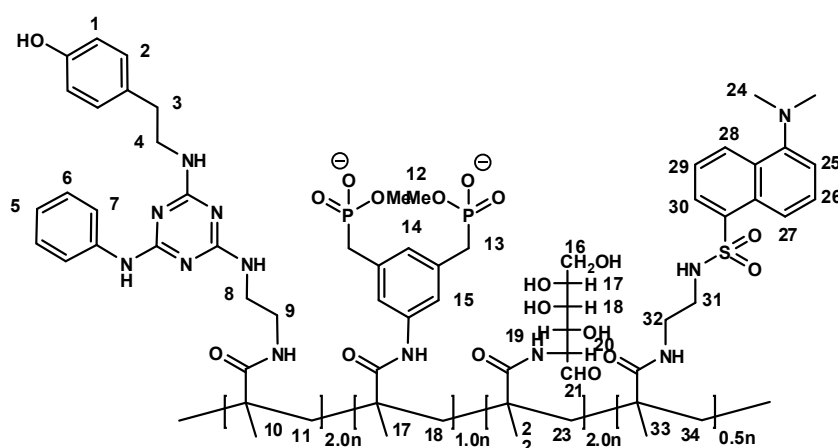
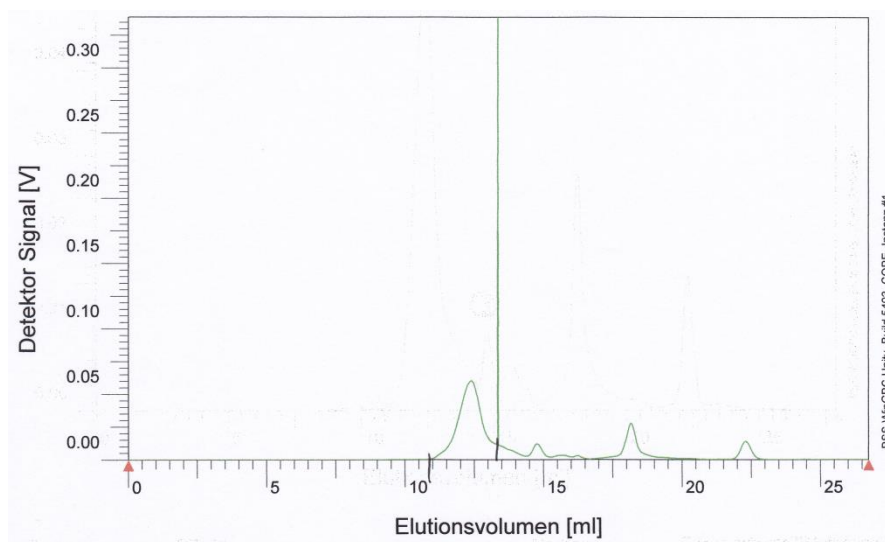
 $\bar{M}_w = 169\,260\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 84\,805\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.00$  $\bar{M}_{w2} = 12\,273\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 11\,915\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.03$ 

Abb. 5.48: GPC-Spektrum von Polymer 44.

**5.3.2.41: Polymer 45**

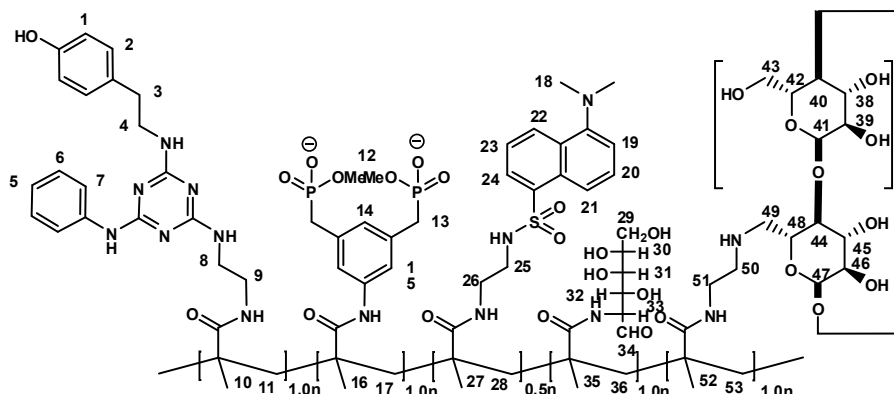
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.70 - 2.35 (m, H-3, H-10, H-11, H-17, H-18, H-22, H-23, H-33, H-34), 2.58 - 4.01 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-16, H-17, H-18,

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

$$\bar{M}_w = 223\,240 \text{ g/mol}, \bar{M}_n = 130\,520 \text{ g/mol}; \text{PDI}_1 = 1.71$$


**Abb. 5.49:** GPC-Spektrum von Polymer 45.

**5.3.2.42: Polymer 46**



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.66 - 2.40 (m, H-3, H-10, H-11, H-16, H-17, H-27, H-28, H-35, H-36, H-52, H-53), 2.64 - 4.09 (m, H-4, H-8, H-9, H-12, H-13, H-18,

H-25, H-26, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-40, H-41, H-42, H-43, H-44, H-45, H-46, H-47, H-48, H-49, H-50, H-51), 5.01 - 5.23 (m, H-34), 6.69 - 7.79 (m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-14, H-15, H-19, H-20, H-23), 7.97 - 8.60 (m, H-21, H-22, H-24).

### Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 184\,610$  g/mol,  $\bar{M}_n = 82\,453$  g/mol;  $PDI_1 = 2.24$

$\bar{M}_{w2} = 11\,615$  g/mol,  $\bar{M}_{n2} = 11\,254$  g/mol;  $PDI_2 = 1.03$

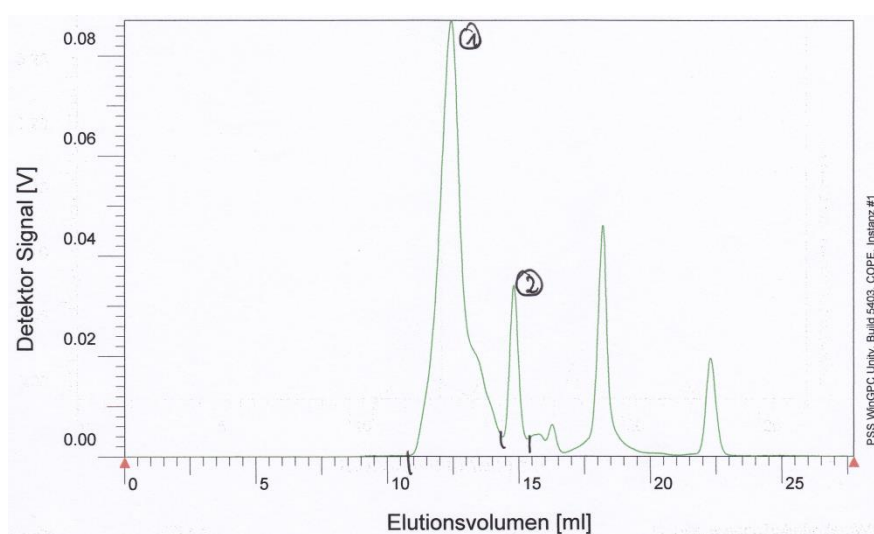
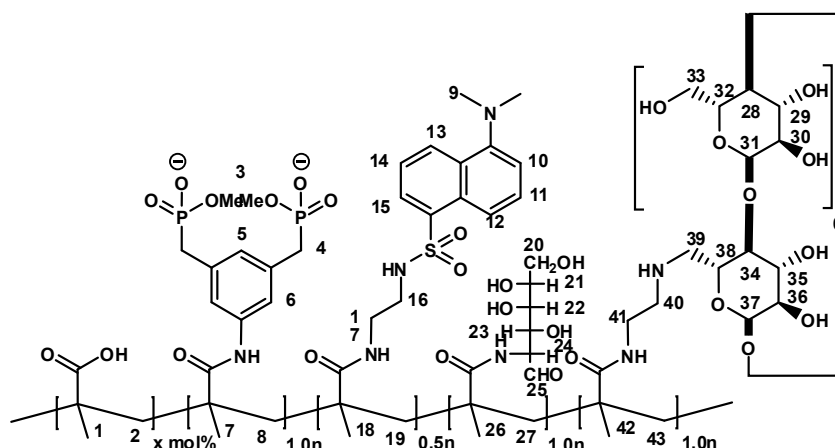


Abb. 5.50: GPC-Spektrum von Polymer 46.

### 5.3.2.43: Polymer 47 – 49



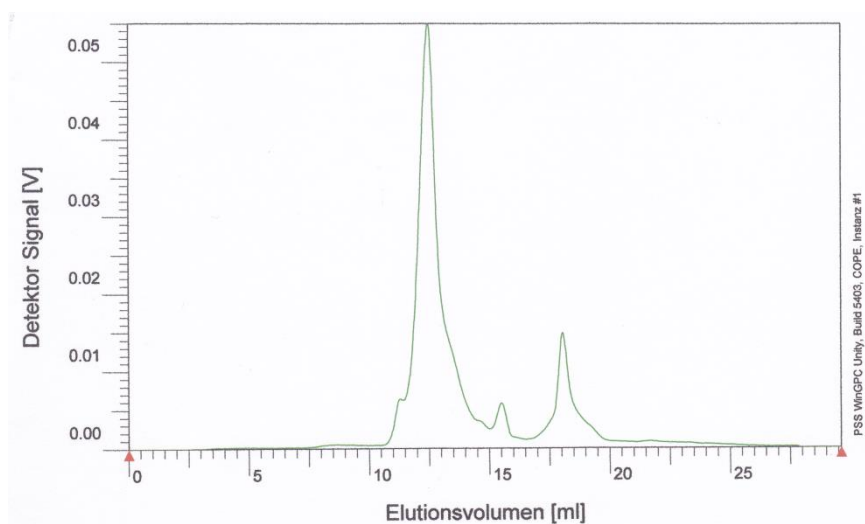
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.76 - 2.18 (m, H-1, H-2, H-7, H-8, H-18, H-19, H-26, H-27, H-42, H-43), 2.69 - 4.23 (m, H-3, H-4, H-9, H-16, H-17, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41), 5.08 - 5.26 (m, H-25), 6.97 - 7.82 (m, H-5, H-6, H-10, H-11, H-14), 7.97 - 8.59 (m, H-12, H-13, H-15).

### **Polymer 47 (5 mol% Methacrylsäure)**

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 138\,630\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 63\,955\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.17$



**Abb. 5.51:** GPC-Spektrum von Polymer 47.

### **Polymer 48 (10 mol% Methacrylsäure)**

**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 211\,930\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 67\,345\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 3.15$



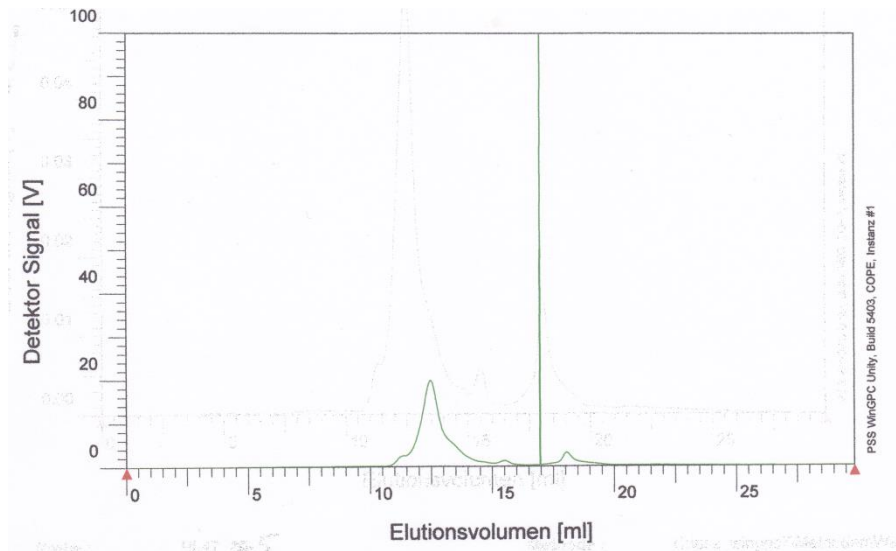


Abb. 5.52: GPC-Spektrum von Polymer 48.

### Polymer 49 (20 mol% Methacrylsäure)

Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 152\,430$  g/mol,  $\bar{M}_n = 78\,571$  g/mol;  $PDI_1 = 1.94$

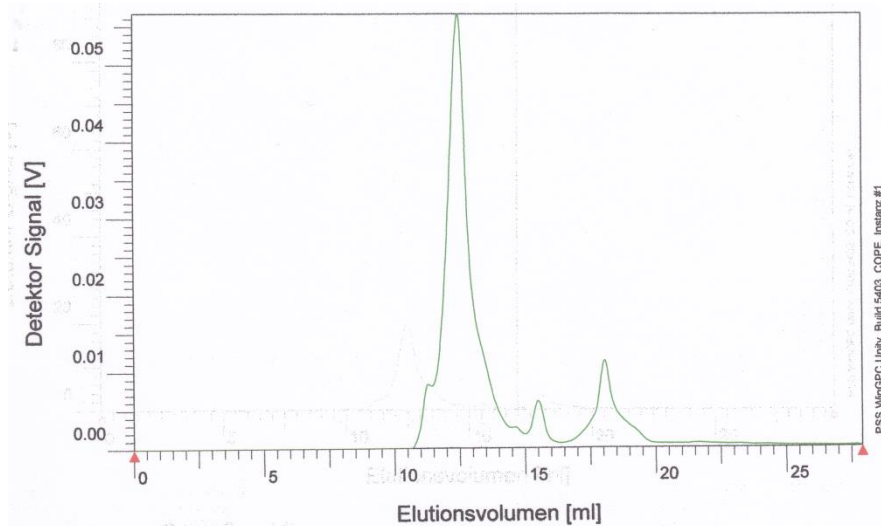
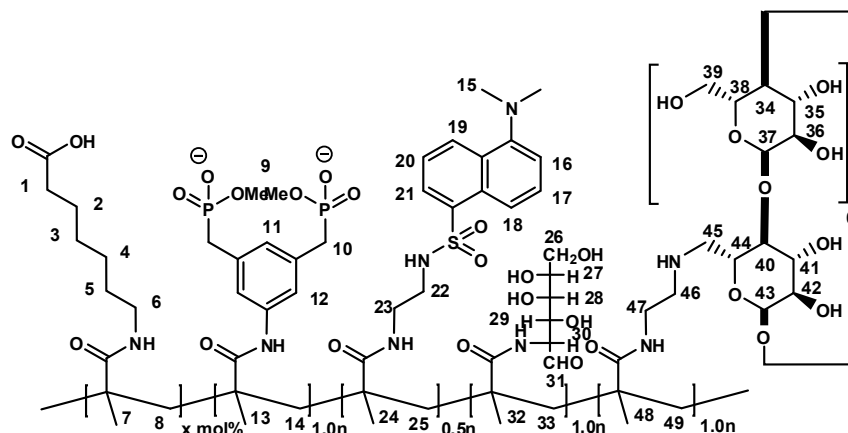


Abb. 5.53: GPC-Spektrum von Polymer 49.

**5.3.2.44: Polymer 50 – 53**

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.76 - 2.18 (m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-13, H-14, H-24, H-25, H-32, H-33, H-48, H-49), 2.69 - 4.23 (m, H-1, H-6, H-9, H-10, H-15, H-22, H-23, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-34, H-35, H-36, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41, H-42, H-43, H-44, H-45, H-46, H-47), 5.08 - 5.26 (m, H-31), 6.97 - 7.82 (m, H-11, H-12, H-16, H-17, H-20), 7.97 - 8.59 (m, H-18, H-19, H-21).

**Polymer 50 (1 mol% Aminohexansäure)**

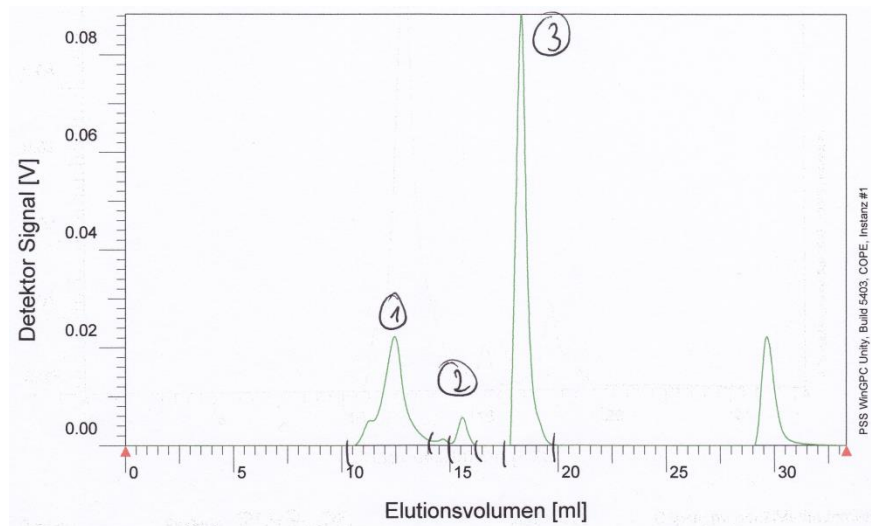
**Gelpermeationschromatographie ( $\text{H}_2\text{O}$ ; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 296\,020\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 105\,460\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.81$

$\bar{M}_{w2} = 4\,689\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 4\,297\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.09$

$\bar{M}_{w3} = 186\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 21\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_3 = 8.86$



**Abb. 5.54:** GPC-Spektrum von Polymer 50.

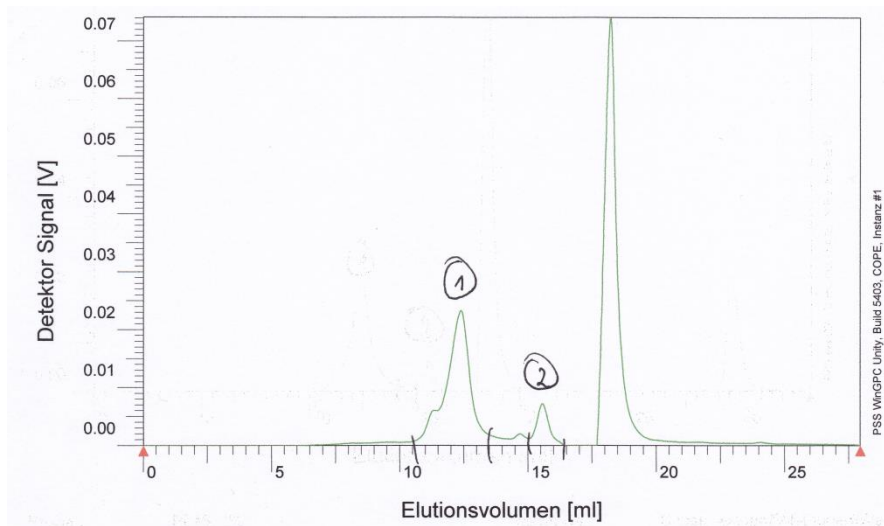
### **Polymer 51 (2 mol% Aminohexansäure)**

**Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 365\,670 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 140\,430 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.60$

$\bar{M}_{w2} = 4\,763 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 4\,195 \text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 1.14$



**Abb. 5.55:** GPC-Spektrum von Polymer 51.

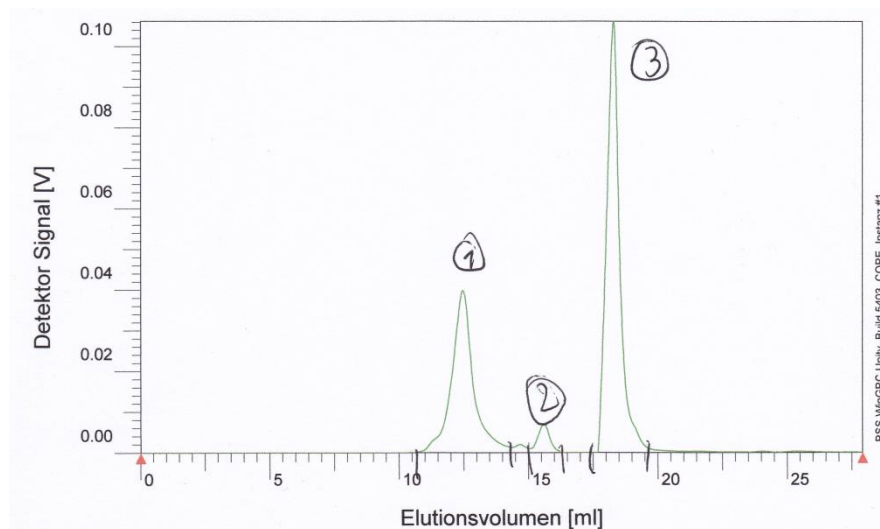
**Polymer 52 (5 mol% Aminohexansäure)****Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 192\,850\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 95\,129\text{ g/mol}$ ;  $PDI_1 = 2.03$

$\bar{M}_{w2} = 4\,770\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 4\,285\text{ g/mol}$ ;  $PDI_2 = 1.11$

$\bar{M}_{w3} = 237\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 24\text{ g/mol}$ ;  $PDI_3 = 9.88$



**Abb. 5.56:** GPC-Spektrum von Polymer 52.

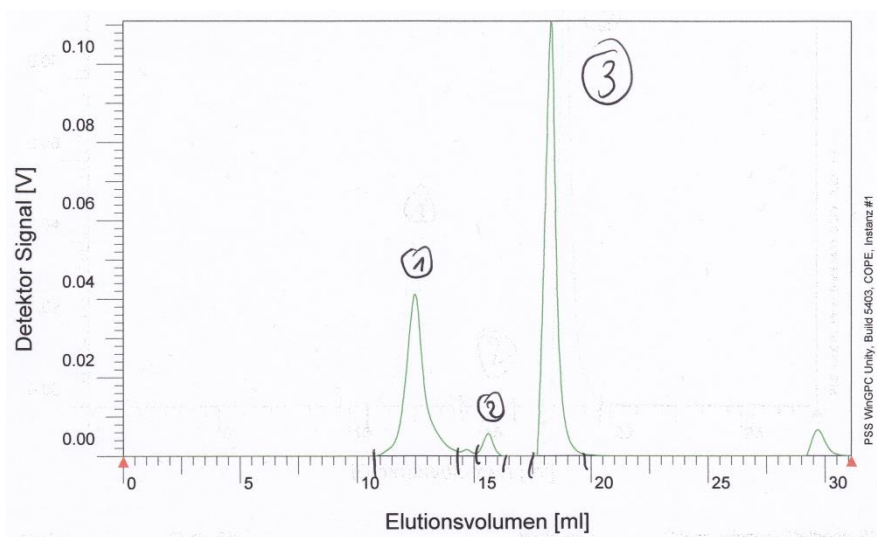
**Polymer 53 (10 mol% Aminohexansäure)****Gelpermeationschromatographie (H<sub>2</sub>O; RI – Detektor) :**

Pullulan – Standard:

$\bar{M}_w = 160\,820\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 87\,006\text{ g/mol}$ ;  $PDI_1 = 1.85$

$\bar{M}_{w2} = 4\,666\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 4\,258\text{ g/mol}$ ;  $PDI_2 = 1.10$

$\bar{M}_{w3} = 240\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n3} = 26\text{ g/mol}$ ;  $PDI_{13} = 9.23$

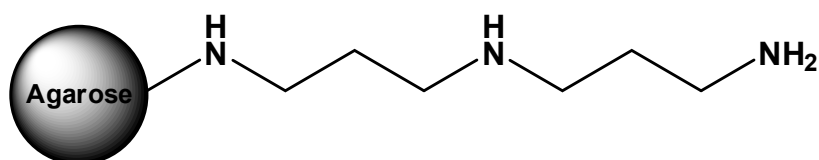


**Abb. 5.57:** GPC-Spektrum von Polymer 53.

## 5.4 Immobilisierung, Capture, Elution

### 5.4.1 Allgemeine Vorschrift zur Kupplung mit EDC und Sulfo-NHS

Das folgende Protokoll beschreibt die Kupplung einer Carbonsäure an einer Amino-Phase. Hierbei handelt es sich um quervernetzte Agarose-Kügelchen, welche mit Diaminodipropylamin (DADPA) funktionalisiert wurde (CarboxyLink™ Coupling Gel).



**Abb. 5.58:** Struktur des CarboxyLink™ Coupling Gel.

#### Präparation des Coupling Gels

1 mL der Coupling Gel Suspension, dies entspricht 500 µL Coupling Gel mit einer Beladung von 16-20 µmol Amin/mL, wurden vorsichtig in eine entsprechende gravity-flow Säule gegeben und für 30 min stehen gelassen. Die überstehende Lösung wurde anschließend abgelassen und das Gel mit 5fachem Säulenvolumen an PBS-Puffer (0.1 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.5) equilibriert.

#### Präparation der zu kuppelnden Carbonsäure

EDC und Sulfo-NHS wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Währenddessen wurde eine Lösung aus der zu kuppelnden Carbonsäure in MES-Puffer (0.1 M, 0.9% NaCl, pH 6.0) mit einer Konzentration von 0.2 mM hergestellt. 0.4 mg EDC und 1.1 Sulfo-NHS wurden zu der Reaktionslösung hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe von Spin-Columns entsalzt und mit Kupplungs-Puffer (0.1 M Natriumphosphat, 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.5) equilibriert.

### Kupplung mit dem Amin

500 µL der aktivierten Carbonsäure (9.7 mg Polymer, 5 µmol Carbonsäure) wurden vorsichtig auf 500 µL Coupling Gel (8-10 µmol Amin) aufgebracht und für 3 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt (end-over-end). Die Suspension wird anschließend für wenige Minuten stehen gelassen, bis sich das Gel am Boden abgesetzt hat. Die überstehende Lösung wird abgelassen und das Gel mit 10fachem Säulenvolumen an Wasch-Puffer (PBS-Puffer für den Elution-Schritt) gewaschen. Die Säulen können mit überstehendem Puffer für wenige Wochen bei 2-4°C gelagert werden.

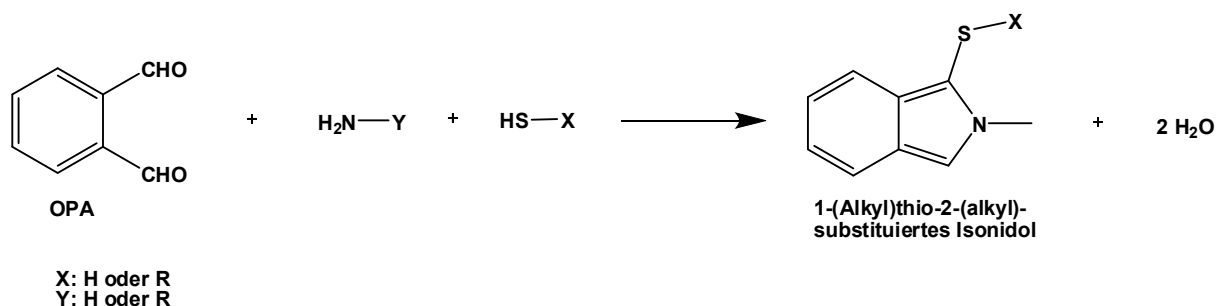
Der Grad der Immobilisierung kann anhand der Dansyl-Fluoreszenz berechnet werden. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe des fluoreszierenden Polymers erstellt und mit den Fraktionen, welche nach der Säule aufgefangen wurden verglichen. Die Differenz bildet die Menge an immobilisiertem Polymer. Es wurden insgesamt 8.44 mg (44%) Polymer immobilisiert.

### Capping

Im Fall noch freier Amine (siehe OPA-Test) kann die Kupplung wiederholt werden bzw. mit Essigsäure oder *N*-terminal geschütztes Glycin durchgeführt werden. Auf diese Weise werden sämtliche freie Amine, welche für den Capture Schritt unvorteilhaft wären maskiert.

### Quantitative Bestimmung primärer Aminogruppen mit *o*-Phthalaldehyd (OPA)<sup>[101], [102]</sup>

Das Verfahren beruht auf der Reaktion von OPA, 2-Mercaptoethanol und primärem Amin in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert.



**Abb. 5.59:** Reaktion des OPA-Reagenz.

Das im Handel erhältliche OPA-Reagenz von Pierce ist bereits mit dem zur Reaktion nötigen Mercaptoethanol versetzt .

Zur Bestimmung muss zunächst eine Kalibriergerade mit 1  $\mu\text{mol/mL}$  OPA-Reagenz im Bereich von 0, 10, 20, ..., 100  $\mu\text{L}$  OPA (1  $\mu\text{mol/mL}$ ) in einer Mikrotiterplatte erstellt werden. Anschließend wird mit Wasser auf 100  $\mu\text{L}$  aufgefüllt.

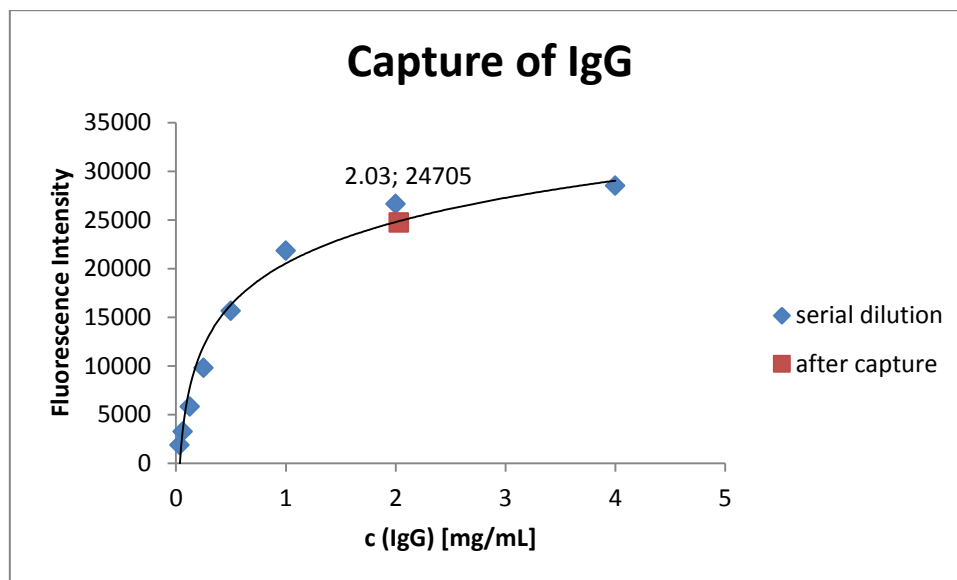
Die Einwaage der Probensubstanz wird so abgeschätzt, dass die vermutete Anzahl an Aminogruppen im Bereich der Kalibriergeraden bis 100 nmol liegt. Die Proben werden anschließend mit 200  $\mu\text{L}$  OPA (0,5  $\mu\text{mol/mL}$ ) versetzt und circa zwei Minuten geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren werden die Proben und die Kalibrierlösungen mit 100  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{mol/mL}$  Glycinlösung versetzt. Anschließend werden Kalibriergerade und die Proben sofort mittels Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge im Bereich von 330-375 nm und einer Emissionswellenlänge von 436-495 nm vermessen. Gemessen wird das überschüssige OPA-Reagenz, das nicht mit den primären Aminogruppen des Gels reagiert hat, sondern noch im Überstand verblieben ist. Nun kann mit Hilfe der Kalibriergeraden auf die Anzahl der primären Aminogruppen geschlossen werden.



### 5.4.2 Vorschrift zum Capture- und Elution-Schritt für Anti-IL8

#### Capture-Schritt

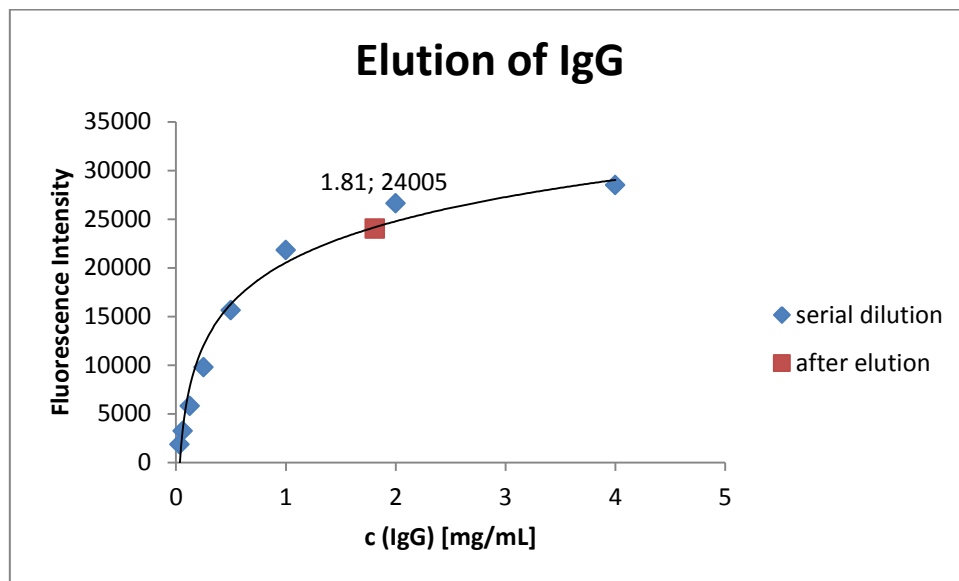
Die Säulen mit dem immobilisierten Polymer werden zuerst mit dem Capture-Puffer (25 mM Phosphat, 20 mM NaCl, pH 5.5) equilibriert. Danach wird eine Lösung des Antikörpers (1 mg/mL) auf die Säule gegeben und in 500  $\mu$ L Schritten aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit dem 10fachen Säulenvolumen an Capture-Puffer gewaschen. Die Waschfraktionen wurden ebenfalls in 500  $\mu$ L Schritten aufgefangen. Die aufgefangenen Fraktionen wurden anschließend mittels Fluoreszenz vermessen. Hierbei wurde die Aminosäure Tryptophan mit einer Wellenlänge von 278 nm angeregt und die Emission bei 350 nm bis 353 nm detektiert.<sup>[103]</sup> Anhand einer Verdünnungsreihe des Antikörpers kann nun die Menge an ungebundenem Protein bestimmt werden. Die Differenz zwischen aufgetragenem und ungebundenem Antikörper entspricht demnach der Menge an gebundenem Antikörper. Es wurden insgesamt 4 mg des Antikörpers dem Gel zur Verfügung gestellt.



**Abb. 5.60:** Konzentrationsbestimmung von ungebundenem Anti IL-8 nach dem Capture-Schritt (pro 500  $\mu$ L Coupling Gel)

Elution-Schritt

Zur Elution des gebundenen Antikörpers wurde eine 1 M wässrige NaCl-Lösung verwendet. Die Säule wurde solange mit dieser Lösung gewaschen bis in der aufgefangenen Fraktion kein Protein (Tryptophan) mehr detektiert werden konnte. Die Menge an eluiertem Antikörper wurde wieder mittels Tryptophan-Fluoreszenz bestimmt.



**Abb. 5.61:** Konzentrationsbestimmung von Anti II-8 nach Elution (pro 500 mL Coupling Gel)

## 5.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay

Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven ELISA, welcher es ermöglicht Bindungskonstanten zwischen Polymer und Anti IL-8 in physiologischer Lösung zu bestimmen. Das Polymer konkurriert dabei mit dem Protein A um die Bindung am Antikörper. Die nachstehende Vorschrift bezieht sich auf eine 96 well Mikrotiterplatte (maxi sorb) der Firma Nunc. Volumenangaben beziehen sich pro well. Es wurden jeweils 3fach-Bestimmungen durchgeführt.

### Verwendete Lösungen

**Protein A-Lösung:** 1 mg Protein A und eine Kapsel Natriumcarbonat/bicarbonat werden in 100 mL dest. H<sub>2</sub>O gelöst. (10 µg Protein A/mL, 0.05 M Puffer, pH 9.6).

**Blocking-Lösung:** 10 x PBS werden auf 100 mL bidest. H<sub>2</sub>O verdünnt mit 2 Tropfen 1M HCl versetzt und 3 g BSA darin gelöst (3% BSA, wt/vol; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Natriumphosphat; pH 7.4).

**Wasch-Lösung:** 900 mg NaCl werden in 100 mL bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und mit 50 µL Tween-20 versetzt (0.9% NaCl, wt/vol; 0.05% Tween-20, vol/vol).

**PolymerStamm-Lösung:** 1 mg Polymer werden in 100 µL PBS-B (0.1% BSA; 0.05% Tween-20) gelöst.

**Polymer-Lösung:** 2 µL der PolymerStamm-Lösung werden in 400 µL PBS-B (0.1 % BSA; 0.05% Tween-20) verdünnt (50 µg/mL Polymer).

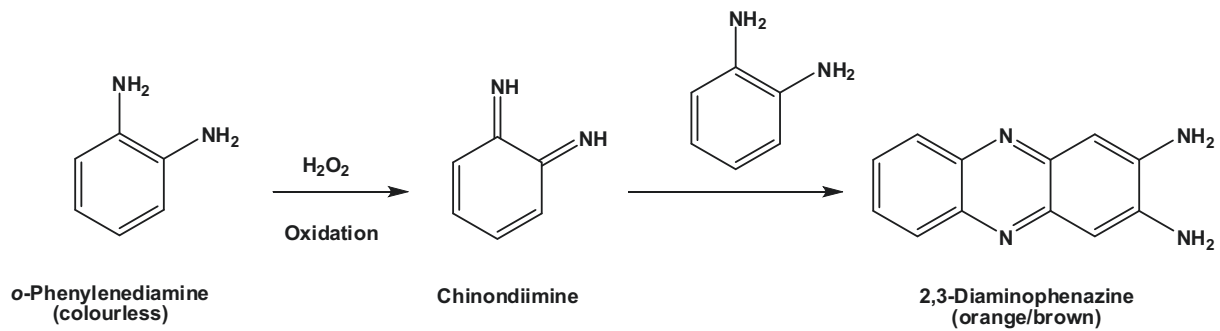
**IgG-Lösung:** 2 µL der IL8 Stamm-Lösung werden in 10 mL PBS-B (0.1% BSA; 0.05% Tween-20) gelöst (0.2 µg/mL).

**Stopp-Lösung:** 1.06 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (> 95%) auf 20 mL dest. H<sub>2</sub>O.

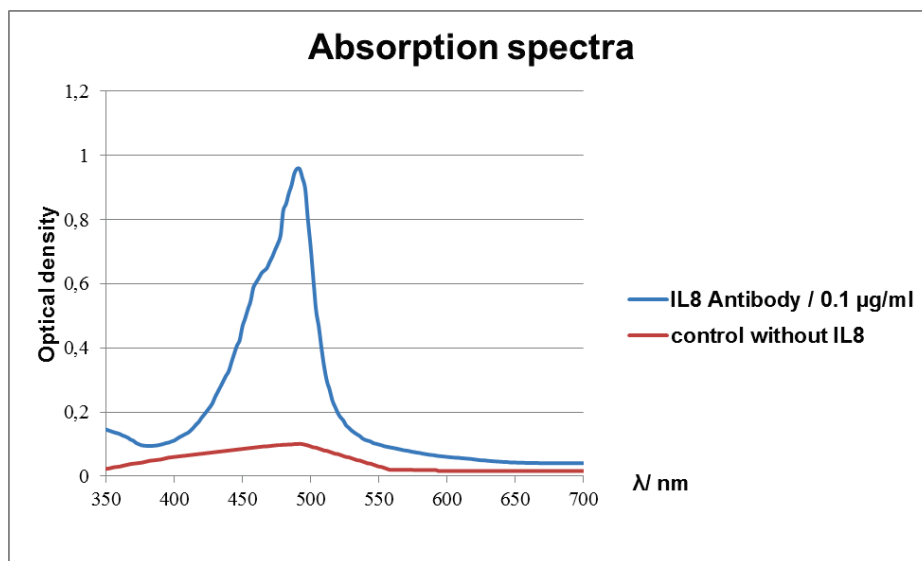
Durchführung

- 1) **Coating:** 100  $\mu\text{L}$  Protein A (10  $\mu\text{g/mL}$ ) in Natriumcarbonat/bicarbonat-Puffer (0.05 M, pH 9.6) über Nacht bei 4°C.
- 2) **Washing:** 3 x 200  $\mu\text{L}$  NaCl (0.9% wt/ vol) mit Tween-20 (0.05% vol/vol).
- 3) **Blocking:** 200  $\mu\text{L}$  BSA (3%, wt/vol) in PBS ( pH 7.4) für 2h bei 37°C.
- 4) **Washing:** 3 x 200  $\mu\text{L}$  NaCl (0.9% wt/ vol) mit Tween-20 (0.05% vol/vol).
- 5) **Standards and Samples:** 100  $\mu\text{L}$  Polymer gelöst in PBS mit BSA (0.1%) und Tween-20 (0.05%)  $\rightarrow$  100  $\mu\text{L}$  IgG (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ) für 1 h bei 37°C (2  $\mu\text{L}$  auf 10 mL).
- 6) **Washing:** 3 x 300  $\mu\text{L}$  NaCl mit Tween-20  
3 x 300  $\mu\text{L}$  dest.  $\text{H}_2\text{O}$
- 7) **HRP:** 3  $\mu\text{L}$  Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) in 3mL PBS mit BSA (0.1%) und Tween-20 (0.05%) verdünnen, ergibt 1  $\mu\text{g/mL}$  HRP; 100  $\mu\text{L}$  dieser Lösung für 30 min bei 37°C.
- 8) **Washing:** 3 x 200  $\mu\text{L}$  mit PBS (+ 0.1% BSA, 0.05% Tween-20)  
3 x 200  $\mu\text{L}$  mit NaCl (+ 0.05% Tween-20)  
3 x 200  $\mu\text{L}$  dest.  $\text{H}_2\text{O}$
- 9) **Substrat:** 100  $\mu\text{L}$  Substrat-Lösung (1 mg o-Phenylendiamin in 1 mL Natrium-Phosphat-Citrat Puffer + 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für 30 min bei 37°C.
- 10) **Stopp:** 30  $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 11) **Absorbance:** Die optische Dichte wurde bei 492 nm gemessen.

Die Farbreaktion beruht auf der Oxidation des farblosen Edukts o-Phenylendiamin zum farbigen Produkt 2,3-Diaminophenazin, welche durch das Enzym HRP-Peroxidase und dessen Substrat Wasserstoffperoxid katalysiert wird.



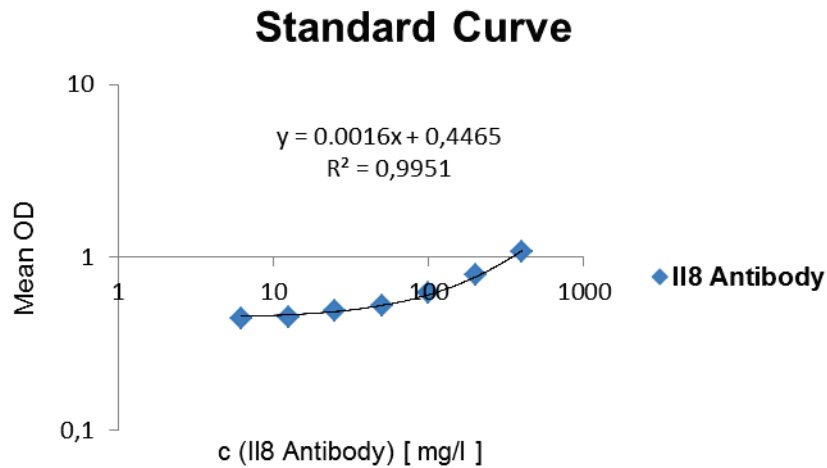
**Abb. 5.5.:** Reaktionsschema der Farbreaktion von *o*-Phenylendiamin.



**Abb. 5.62:** Spektrum der Absorptionsmessung von 2,3-Diaminophenazin mit einem Maximum bei 492 nm.

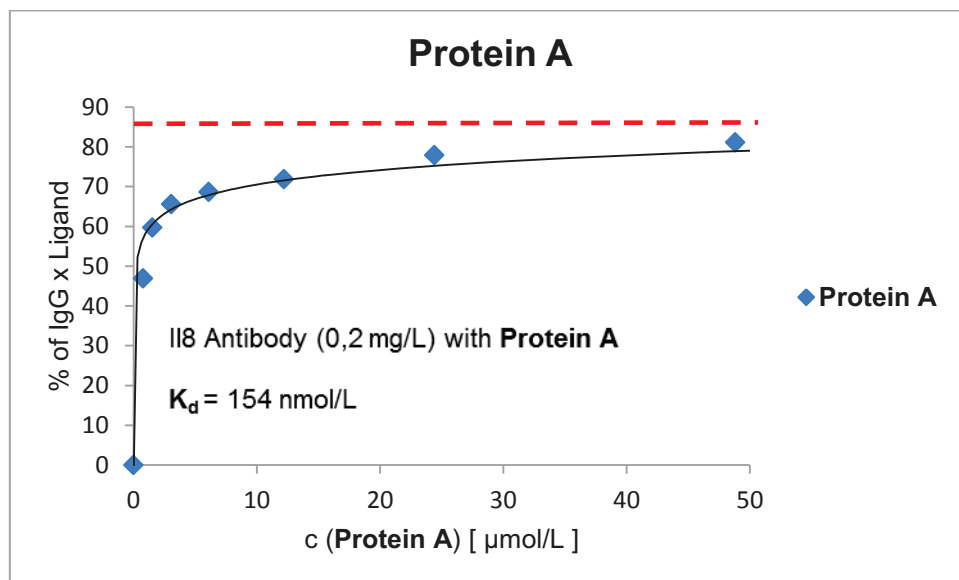
### Bindungskonstanten

Anhand einer Standardkurve kann nun für jede optische Dichte die Menge an gebundenem Antikörper und die Menge an Antikörper, welche durch das Polymer komplexiert wurde berechnet werden. Der Antikörper/Polymer Komplex wurde in Abhängigkeit der Polymerkonzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante durch nichtlineare Regression nach den Methoden von Cheng und Prusoff <sup>[104]</sup> und Rodbard und Lewald <sup>[105]</sup> bestimmt.

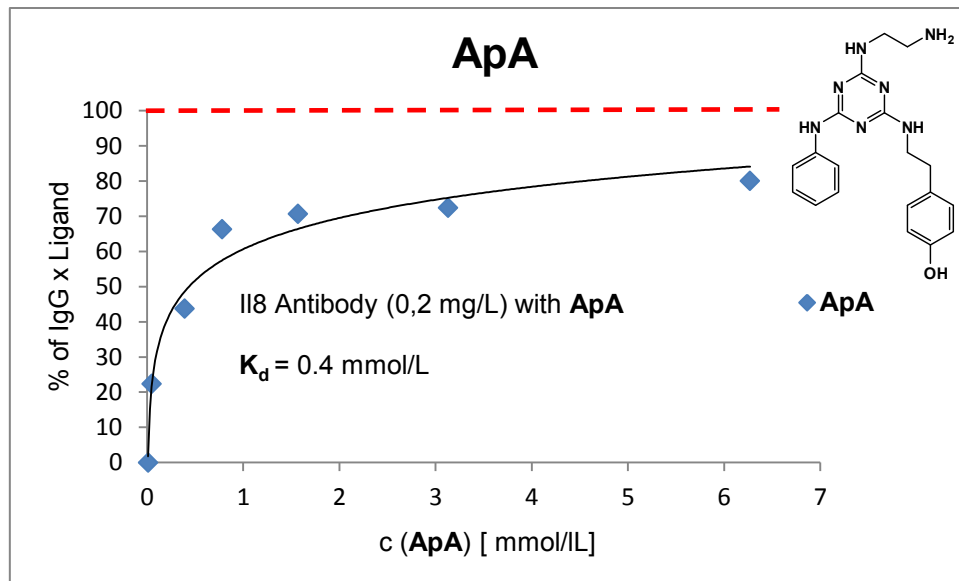


**Abb. 5.63:** Standardkurve einer Anti II-8 Verdünnungsreihe.

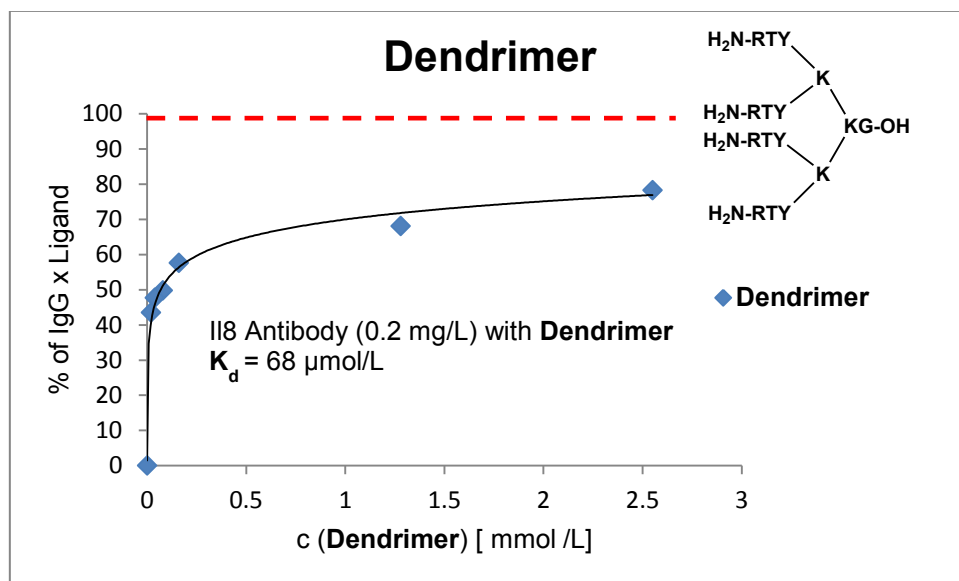
Im Folgenden sind die Bindungskurven einiger Polymere bzw. Monomere und ausgewählte Moleküle aufgeführt, welche mit diesem Verfahren aufgenommen wurden.



**Abb. 5.64:** ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit **Protein A**.



**Abb. 5.65:** ELISA-Bindungskurve von Anti Il-8 mit dem **ApA-Molekül**.



**Abb. 5.66:** ELISA-Bindungskurve von Anti Il-8 mit dem **Dendrimer**.

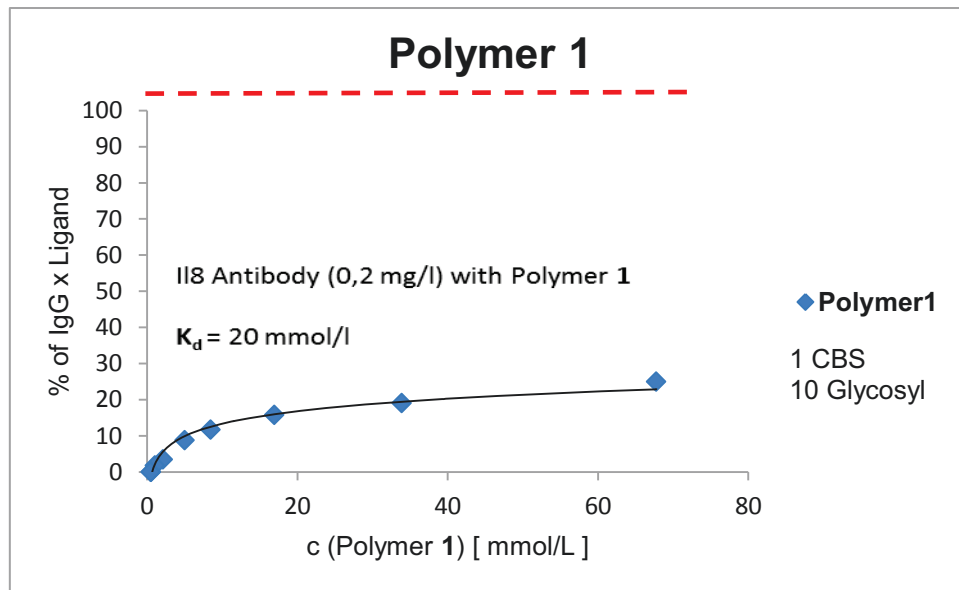


Abb. 5.67: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer 1.

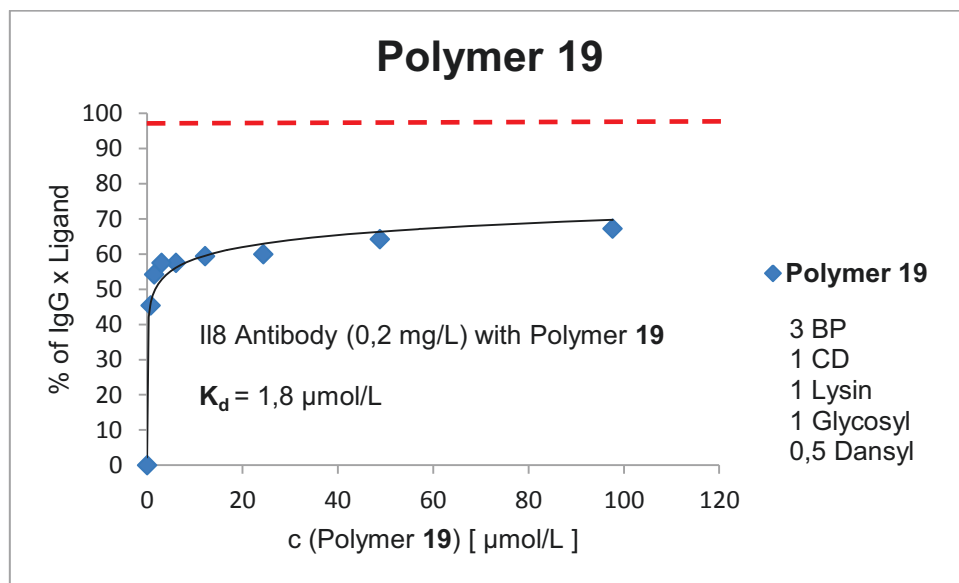


Abb. 5.68: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer 19.



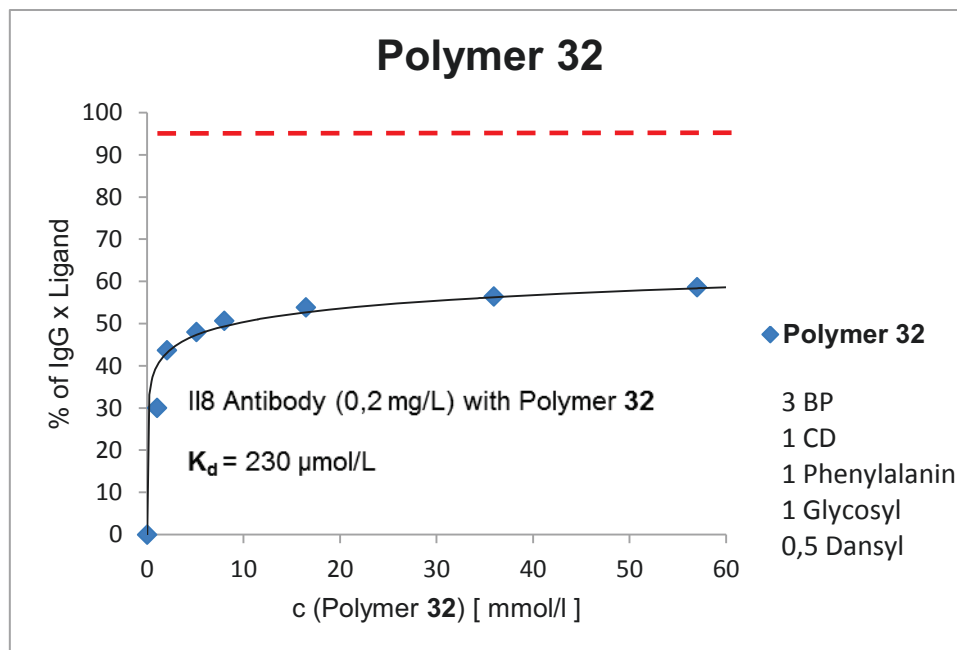


Abb. 5.69: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer 32.

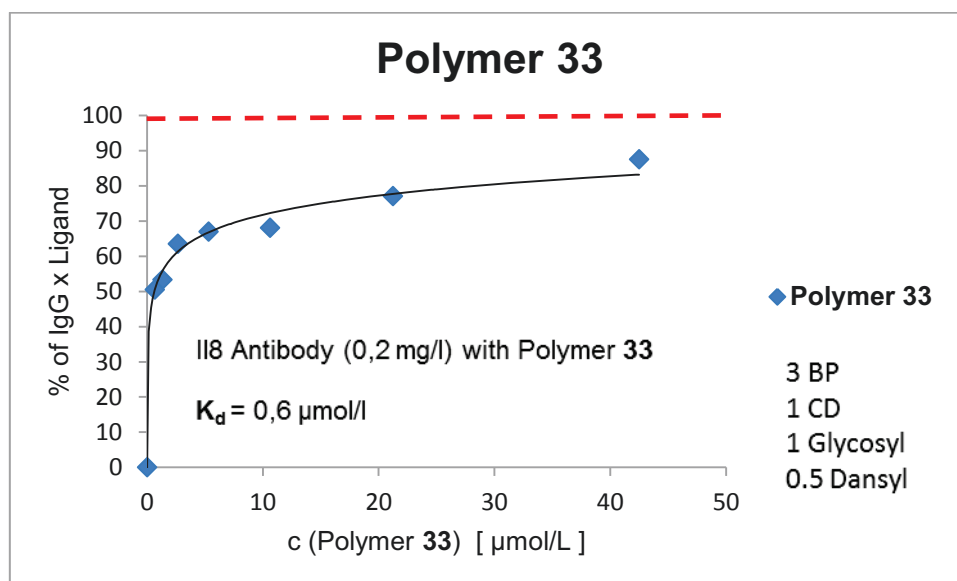
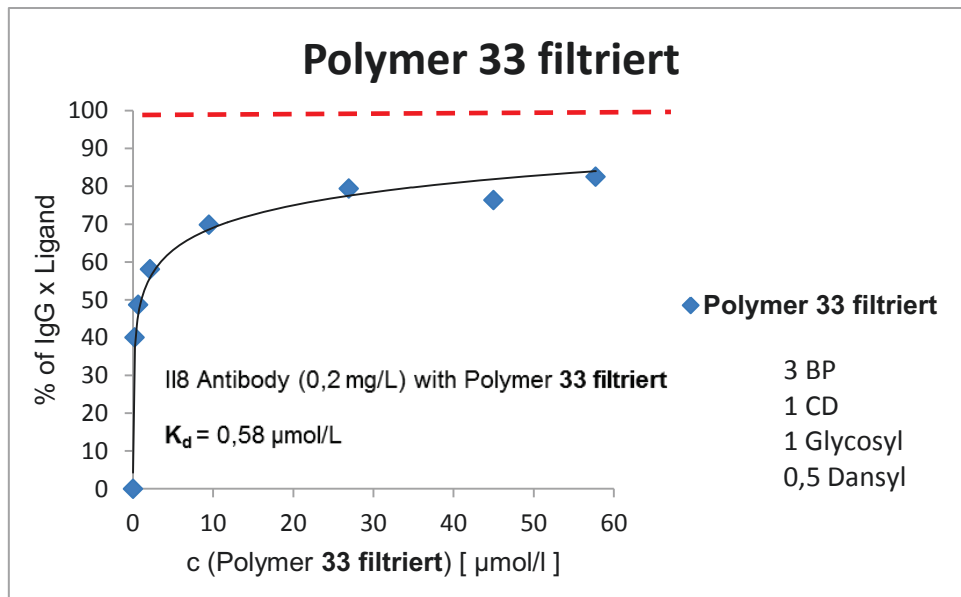
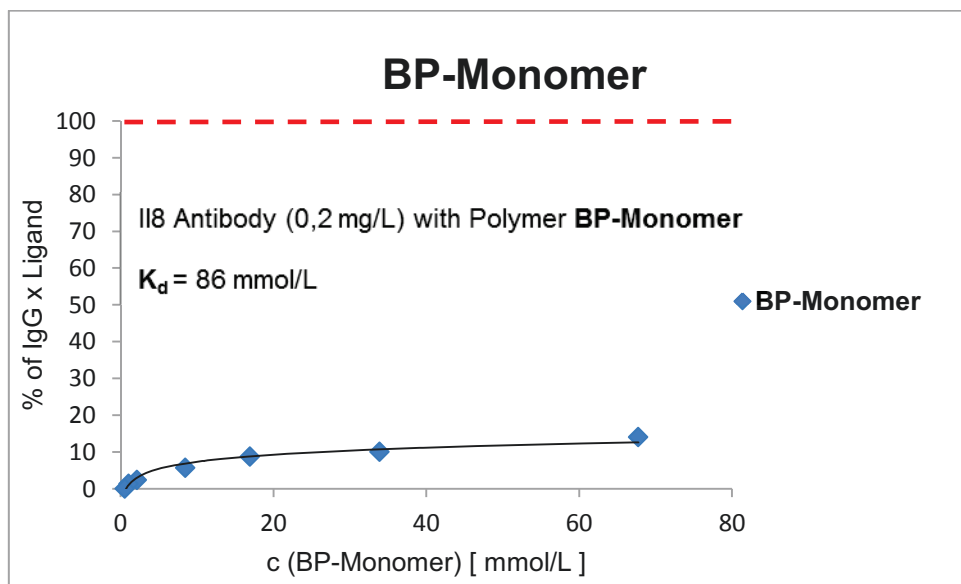


Abb. 5.70: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer 33.



**Abb. 5.71:** ELISA-Bindungskurve von Anti IL-8 mit Polymer 33 nach Ultrafiltration.



**Abb. 5.72:** ELISA-Bindungskurve von Anti IL-8 mit dem BP-Monomer.

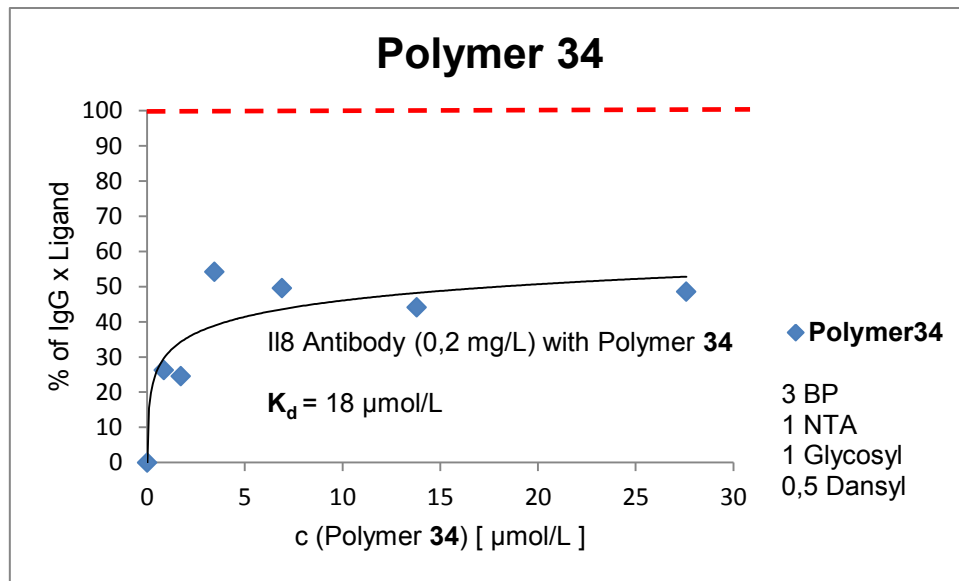


Abb. 5.73: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer 34.

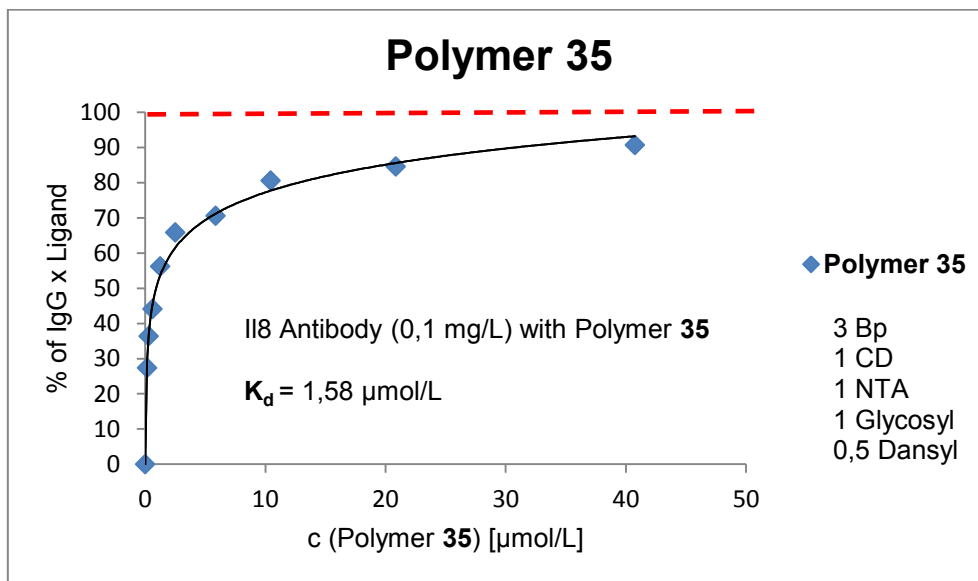


Abb. 5.74: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer 35.

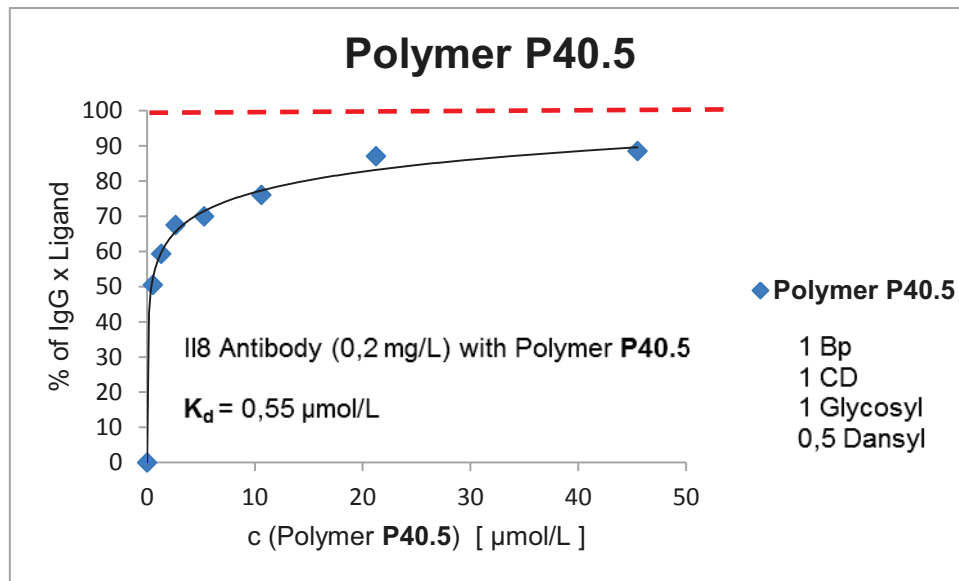


Abb. 5.75: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer **P40.5**.

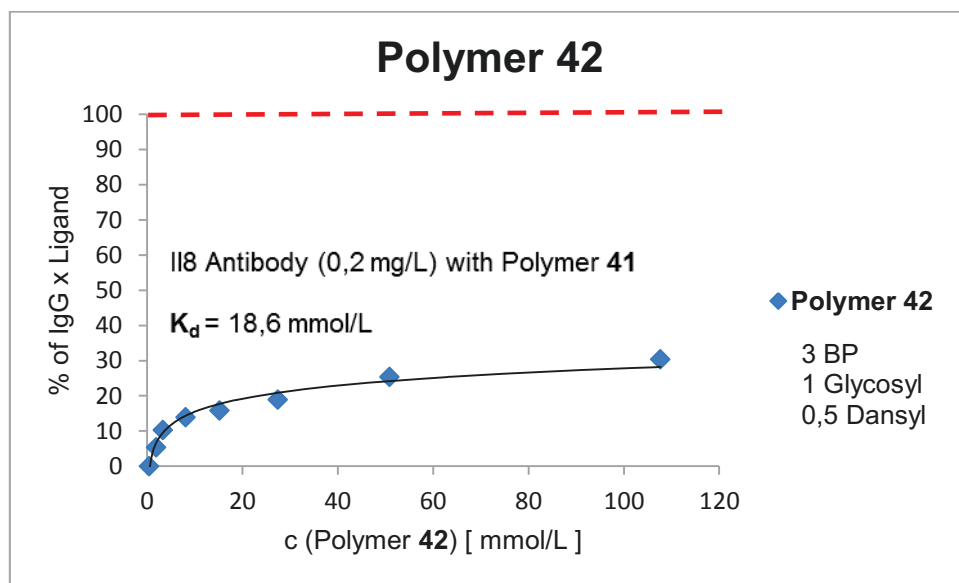
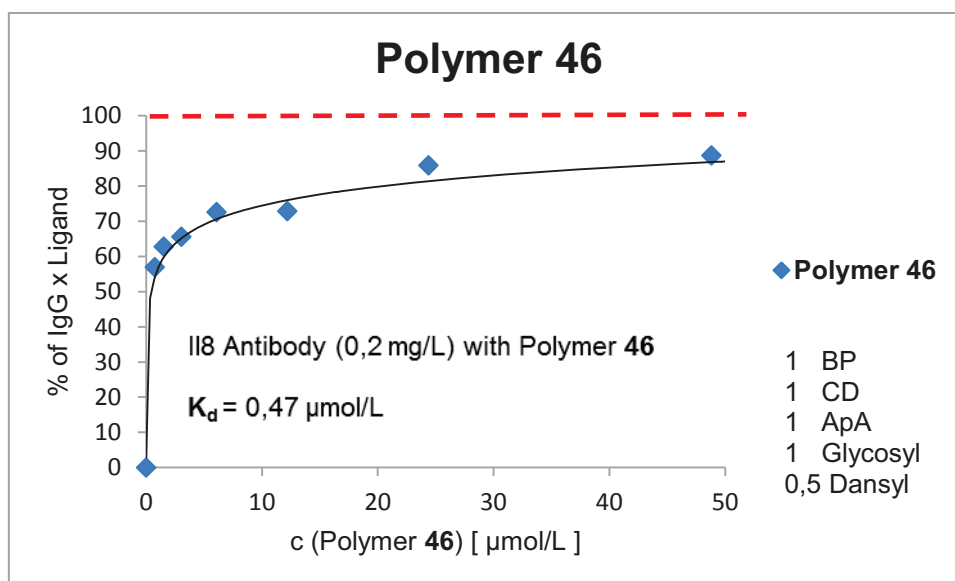


Abb. 5.76: ELISA-Bindungskurve von Anti II-8 mit Polymer **42**.

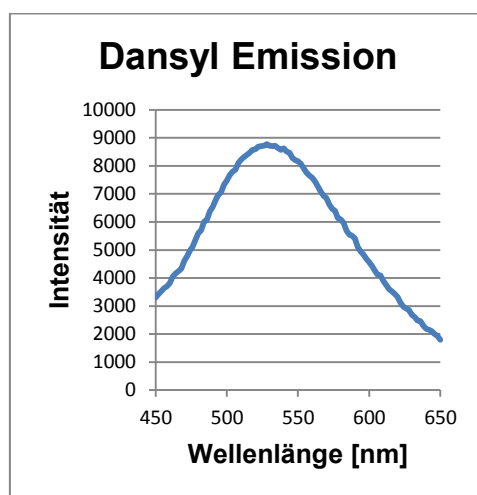


**Abb. 5.77:** ELISA-Bindungskurve von Anti IL-8 mit Polymer 46.

## 5.6 Fluoreszenztitrationen

### 5.6.1 Allgemeine Vorgehensweise

Es wurde eine Lösung des Polymers **46** in wässrigem Phosphatpuffer (25 mM; 20 mM NaCl; pH 7.0) angesetzt. Die Protein-Stammlösung wurde hergestellt, indem das Protein in der Polymer-Lösung gelöst wurde. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich die Polymer-Konzentration während der Titration nicht verändert. Anschließend füllt man die Polymer-Lösung in eine auf 25°C temperierte Küvette und gibt portionsweise die Protein-Stammlösung hinzu. Nach jeder Zugabe wurde die gesamte Lösung gut durchmischt und bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm vermessen. Beobachtet wurde eine Fluoreszenzänderung bei einer Emissionswellenlänge von 523 nm. Zur Aufklärung der Stöchiometrie des Komplexes wurde die Konzentration des Polymers mit einem virtuellen Faktor multipliziert, so dass der Job-Plot<sup>[106]</sup> einen 1 : 1 Komplex vorgibt. Mit dieser Methode der kontinuierlichen Variation<sup>[107]</sup> kann durch Auftragung des Molenbruchs gegen  $\Delta I$  (Fluoreszenzänderung)\*Molenbruch die jeweiligen Stöchiometrien bestimmt werden. Der Korrekturfaktor gibt dann die Komplexstöchiometrie an. Bindungskonstanten wurden anschließend mit dem Programm SigmaPlot für einen 1 : 1 Komplex (korrigierte Konzentrationen) anhand einer nichtlinearen Regression berechnet, unter der Annahme, dass bei einem 2 : 1 oder 1 : 2 Komplex die erste Bindung unabhängig von der zweiten Bindung ist.<sup>[108][109]</sup>



**Abb. 5.78:** Emissionsspektrum von Polymer **46** bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm.

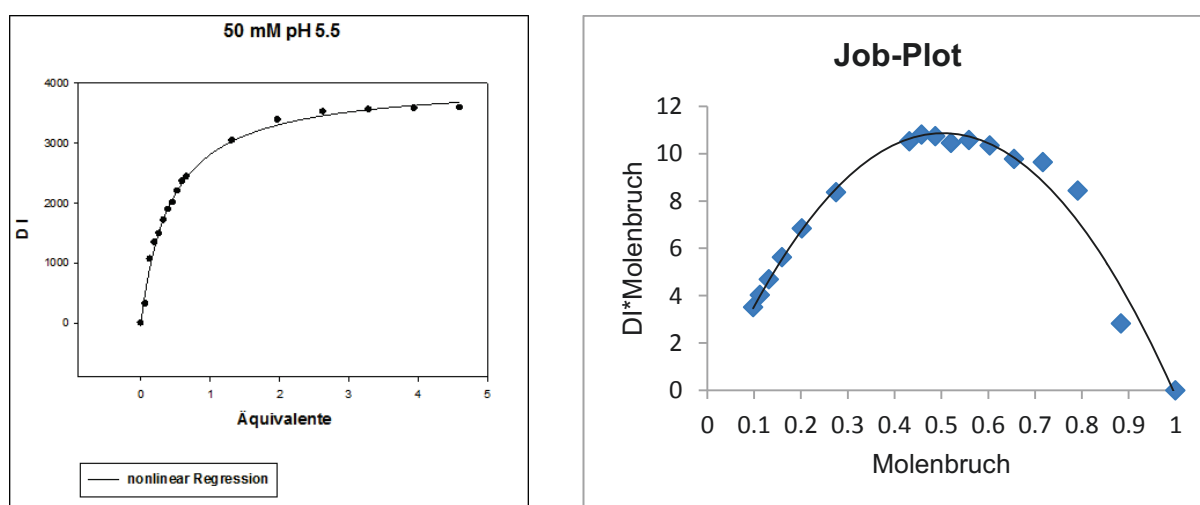
### 5.6.2 Polymer P40.5 gegen Anti-Il8 (50 mM NaCl; pH 5.5)

$$K_d = 266 \cdot 10^{-9} \text{ M } \pm 7\%$$

Stöchiometrie 1 : 1.2 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.83

c (Polymer P40.5) [mol/l]	c (IgG) [mol/l]	Eq = c1/c2	D I	Molenbruch	DI*Molenbruch
9,50E-07	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
9,50E-07	1,25E-07	1,32E-01	3,2	8,84E-01	2,83E+00
9,50E-07	2,50E-07	2,63E-01	10,65	7,92E-01	8,43E+00
9,50E-07	3,75E-07	3,95E-01	13,44	7,17E-01	9,64E+00
9,50E-07	5,00E-07	5,26E-01	14,91	6,55E-01	9,77E+00
9,50E-07	6,25E-07	6,58E-01	17,14	6,03E-01	1,03E+01
9,50E-07	7,50E-07	7,89E-01	18,9	5,59E-01	1,06E+01
9,50E-07	8,75E-07	9,21E-01	20,07	5,21E-01	1,04E+01
9,50E-07	1,00E-06	1,05E+00	22,02	4,87E-01	1,07E+01
9,50E-07	1,13E-06	1,18E+00	23,58	4,58E-01	1,08E+01
9,50E-07	1,25E-06	1,32E+00	24,36	4,32E-01	1,05E+01
9,50E-07	2,50E-06	2,63E+00	30,4	2,75E-01	8,37E+00
9,50E-07	3,75E-06	3,95E+00	33,86	2,02E-01	6,84E+00
9,50E-07	5,00E-06	5,26E+00	35,2	1,60E-01	5,62E+00
9,50E-07	6,25E-06	6,58E+00	35,57	1,32E-01	4,69E+00
9,50E-07	7,50E-06	7,89E+00	35,78	1,12E-01	4,02E+00
9,50E-07	8,75E-06	9,21E+00	35,9	9,79E-02	3,52E+00

**Tabelle 5.1:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **P40.5** gegen Anti-Il8 mit 50 mM NaCl bei pH 5.5.



**Abb. 5.79:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

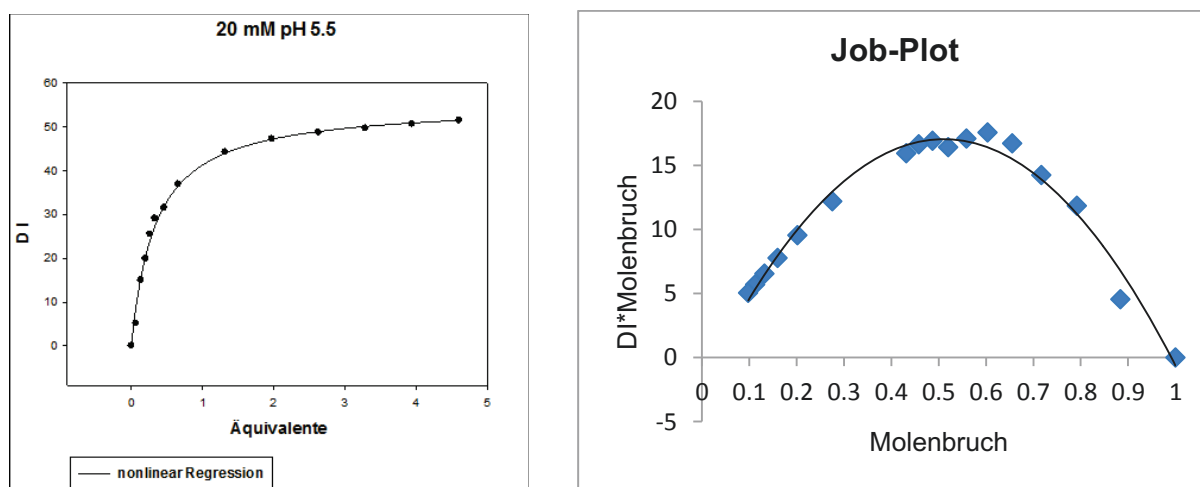
### 5.6.3 Polymer P40.5 gegen Anti-II8 (20 mM NaCl; pH 5.5)

$$K_d = 128 \cdot 10^{-9} \text{ M } \pm 9,5\%$$

Stöchiometrie 1 : 1.2 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.83

c (Polymer P40.5) [mol/L]	c (IgG) [mol/L]	Eq = c1/c2	D I	Molenbruch	DI*Molenbruch
9,50E-07	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
9,50E-07	1,25E-07	1,32E-01	5,13	8,84E-01	4,53E+00
9,50E-07	2,50E-07	2,63E-01	14,96	7,92E-01	1,18E+01
9,50E-07	3,75E-07	3,95E-01	19,86	7,17E-01	1,42E+01
9,50E-07	5,00E-07	5,26E-01	25,49	6,55E-01	1,67E+01
9,50E-07	6,25E-07	6,58E-01	29,1	6,03E-01	1,76E+01
9,50E-07	7,50E-07	7,89E-01	30,56	5,59E-01	1,71E+01
9,50E-07	8,75E-07	9,21E-01	31,49	5,21E-01	1,64E+01
9,50E-07	1,00E-06	1,05E+00	34,72	4,87E-01	1,69E+01
9,50E-07	1,13E-06	1,18E+00	36,32	4,58E-01	1,66E+01
9,50E-07	1,25E-06	1,32E+00	36,88	4,32E-01	1,59E+01
9,50E-07	2,50E-06	2,63E+00	44,21	2,75E-01	1,22E+01
9,50E-07	3,75E-06	3,95E+00	47,15	2,02E-01	9,53E+00
9,50E-07	5,00E-06	5,26E+00	48,65	1,60E-01	7,77E+00
9,50E-07	6,25E-06	6,58E+00	49,61	1,32E-01	6,55E+00
9,50E-07	7,50E-06	7,89E+00	50,61	1,12E-01	5,69E+00
9,50E-07	8,75E-06	9,21E+00	51,45	9,79E-02	5,04E+00

**Tabelle 5.2:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **P40.5** gegen Anti-II8 mit 20 mM NaCl bei pH 5.5.



**Abb. 5.80:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.



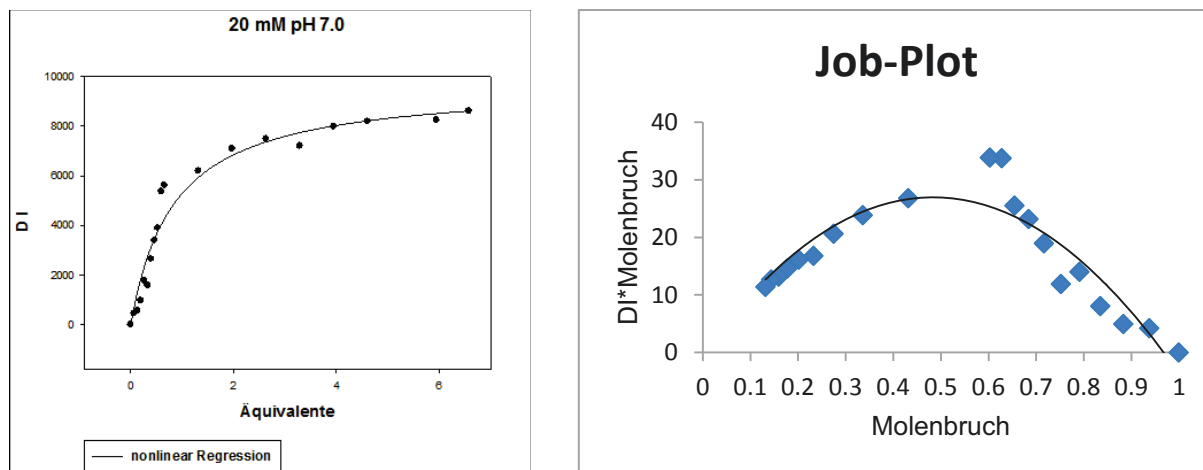
**5.6.4 Polymer P40.5 gegen Anti-Il8 (20 mM NaCl; pH 7.0)**

$$K_d = 145 \cdot 10^{-9} \text{ M } \pm 20\%$$

Stöchiometrie 1 : 1.3 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.77

c (Polymer P40.5) [mol/L]	c (IgG) [mol/L]	Eq = c1/c2	D I 523 nm	Molenbruch	DI*Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	1,25E-07	6,58E-02	4,52	9,38E-01	4,24E+00
1,90E-06	2,50E-07	1,32E-01	5,6	8,84E-01	4,95E+00
1,90E-06	3,75E-07	1,97E-01	9,66	8,35E-01	8,07E+00
1,90E-06	5,00E-07	2,63E-01	17,71	7,92E-01	1,40E+01
1,90E-06	6,25E-07	3,29E-01	15,8	7,52E-01	1,19E+01
1,90E-06	7,50E-07	3,95E-01	26,43	7,17E-01	1,89E+01
1,90E-06	8,75E-07	4,61E-01	33,86	6,85E-01	2,32E+01
1,90E-06	1,00E-06	5,26E-01	38,93	6,55E-01	2,55E+01
1,90E-06	1,13E-06	5,92E-01	53,67	6,28E-01	3,37E+01
1,90E-06	1,25E-06	6,58E-01	56,14	6,03E-01	3,39E+01
1,90E-06	2,50E-06	1,32E+00	62,02	4,32E-01	2,68E+01
1,90E-06	3,75E-06	1,97E+00	70,92	3,36E-01	2,38E+01
1,90E-06	5,00E-06	2,63E+00	74,88	2,75E-01	2,06E+01
1,90E-06	6,25E-06	3,29E+00	72,04	2,33E-01	1,68E+01
1,90E-06	7,50E-06	3,95E+00	79,83	2,02E-01	1,61E+01
1,90E-06	8,75E-06	4,61E+00	81,86	1,78E-01	1,46E+01
1,90E-06	1,00E-05	5,26E+00	82,48	1,60E-01	1,32E+01
1,90E-06	1,13E-05	5,92E+00	87,83	1,44E-01	1,27E+01
1,90E-06	1,25E-05	6,58E+00	86,11	1,32E-01	1,14E+01

**Tabelle 5.3:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **P40.5** gegen Anti-Il8 mit 20 mM NaCl bei pH 7.0.



**Abb. 5.81:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

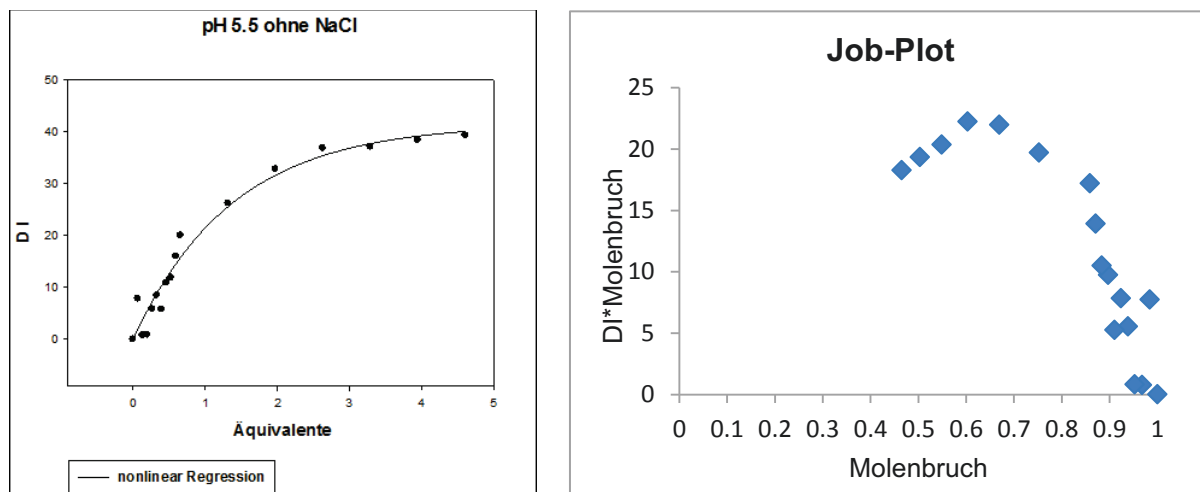
### 5.6.5 Polymer P40.5 gegen Anti-II8 (0 mM NaCl; pH 5.5)

$$K_d (1:1) = 66 \cdot 10^{-9} \text{ M } \pm 18\%$$

Stöchiometrie 1 : 1.5 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.66

c (Polymer P40.5) [mol/l]	c (IgG) [mol/l]	Eq = c1/c2	D I	Molenbruch	D I * Molenbruch
7,60E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
7,60E-06	1,25E-07	1,64E-02	7,86	9,84E-01	7,73E+00
7,60E-06	2,50E-07	3,29E-02	0,78	9,68E-01	7,55E-01
7,60E-06	3,75E-07	4,93E-02	0,86	9,53E-01	8,20E-01
7,60E-06	5,00E-07	6,58E-02	5,9	9,38E-01	5,54E+00
7,60E-06	6,25E-07	8,22E-02	8,47	9,24E-01	7,83E+00
7,60E-06	7,50E-07	9,87E-02	5,78	9,10E-01	5,26E+00
7,60E-06	8,75E-07	1,15E-01	10,86	8,97E-01	9,74E+00
7,60E-06	1,00E-06	1,32E-01	11,87	8,84E-01	1,05E+01
7,60E-06	1,13E-06	1,48E-01	15,98	8,71E-01	1,39E+01
7,60E-06	1,25E-06	1,64E-01	20,03	8,59E-01	1,72E+01
7,60E-06	2,50E-06	3,29E-01	26,19	7,52E-01	1,97E+01
7,60E-06	3,75E-06	4,93E-01	32,8	6,70E-01	2,20E+01
7,60E-06	5,00E-06	6,58E-01	36,83	6,03E-01	2,22E+01
7,60E-06	6,25E-06	8,22E-01	37,06	5,49E-01	2,03E+01
7,60E-06	7,50E-06	9,87E-01	38,41	5,03E-01	1,93E+01
7,60E-06	8,75E-06	1,15E+00	39,3	4,65E-01	1,83E+01

**Tabelle 5.4:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **P40.5** gegen Anti-II8 mit 0 mM NaCl bei pH 5.5.



**Abb. 5.82:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

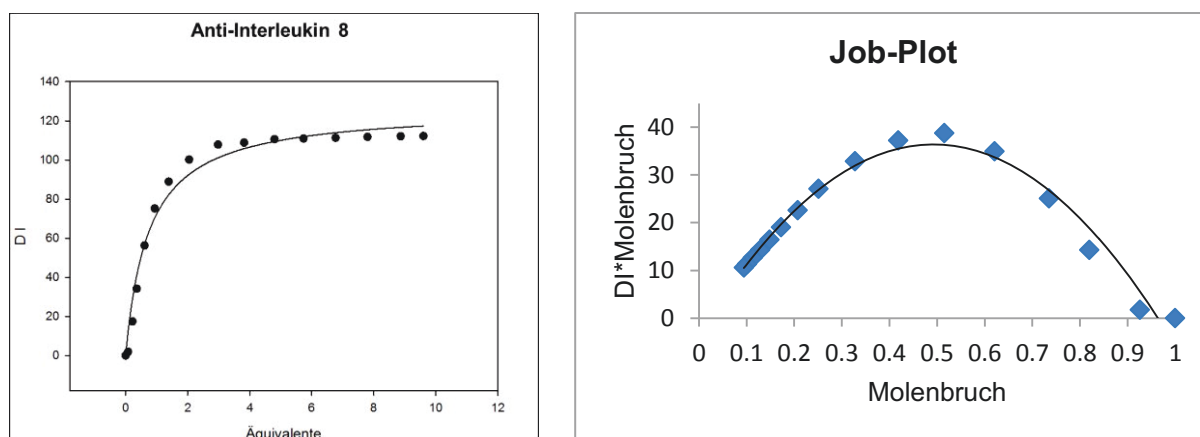
### 5.6.6 Polymer 46 gegen Anti-II8 (20 mM NaCl; pH 7.0)

$$K_d (1:1) = 1.78 \cdot 10^{-7} \text{ M } \pm 13\%$$

Stöchiometrie 1.2 : 1 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.83

c (Polymer 46) [mol/L]	c (IgG) [mol/L]	$E_q = c_1/c_2$	D I 523 nm	Molenbruch	D I * Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	1,52E-07	0,08	1,91	9,26E-01	1,77E+00
1,90E-06	4,18E-07	0,22	17,44	8,20E-01	1,43E+01
1,90E-06	6,84E-07	0,36	34,14	7,35E-01	2,51E+01
1,90E-06	1,16E-06	0,61	56,31	6,21E-01	3,50E+01
1,90E-06	1,79E-06	0,94	75,17	5,15E-01	3,87E+01
1,90E-06	2,64E-06	1,39	88,9	4,18E-01	3,72E+01
1,90E-06	3,90E-06	2,05	100,21	3,28E-01	3,29E+01
1,90E-06	5,66E-06	2,98	107,84	2,51E-01	2,71E+01
1,90E-06	7,26E-06	3,82	108,85	2,07E-01	2,26E+01
1,90E-06	9,12E-06	4,8	110,65	1,72E-01	1,91E+01
1,90E-06	1,09E-05	5,74	110,95	1,48E-01	1,65E+01
1,90E-06	1,29E-05	6,77	111,32	1,29E-01	1,43E+01
1,90E-06	1,48E-05	7,8	111,79	1,14E-01	1,27E+01
1,90E-06	1,69E-05	8,87	112,11	1,01E-01	1,14E+01
1,90E-06	1,82E-05	9,6	112,18	9,43E-02	1,06E+01

**Tabelle 5.5:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer 46 gegen Anti-II8.



**Abb. 5.83:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve von Polymer **46** gegen Anti IL-8; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

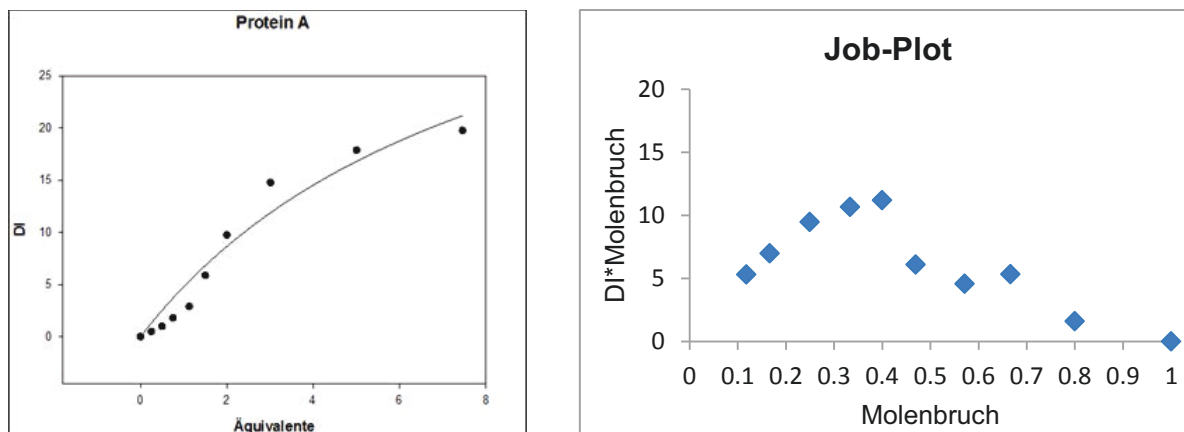
### 5.6.7 Polymer 46 gegen Protein A (20 mM NaCl; pH 7.0)

$$K_d (1:1) = 7.14 \cdot 10^{-3} \text{ M } \pm 95\%$$

Stöchiometrie 1.2 : 1 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.82

c (Polymer 46) [mol/L]	c (Protein A) [mol/L]	Eq = c1/c2	DI 523 nm	Molenbruch	DI*Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	4,75E-07	0,25	2	8,00E-01	1,60E+00
1,90E-06	9,50E-07	0,5	8	6,67E-01	5,33E+00
1,90E-06	1,43E-06	0,75	8	5,71E-01	4,57E+00
1,90E-06	2,15E-06	1,13	13	4,69E-01	6,10E+00
1,90E-06	2,85E-06	1,5	28	4,00E-01	1,12E+01
1,90E-06	3,80E-06	2	32	3,33E-01	1,07E+01
1,90E-06	5,72E-06	3,01	38	2,49E-01	9,48E+00
1,90E-06	9,52E-06	5,01	42	1,66E-01	6,99E+00
1,90E-06	1,42E-05	7,46	45	1,18E-01	5,32E+00

**Tabelle 5.6:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **46** gegen Protein A.



**Abb. 5.84:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve von Polymer **46** gegen Protein A; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

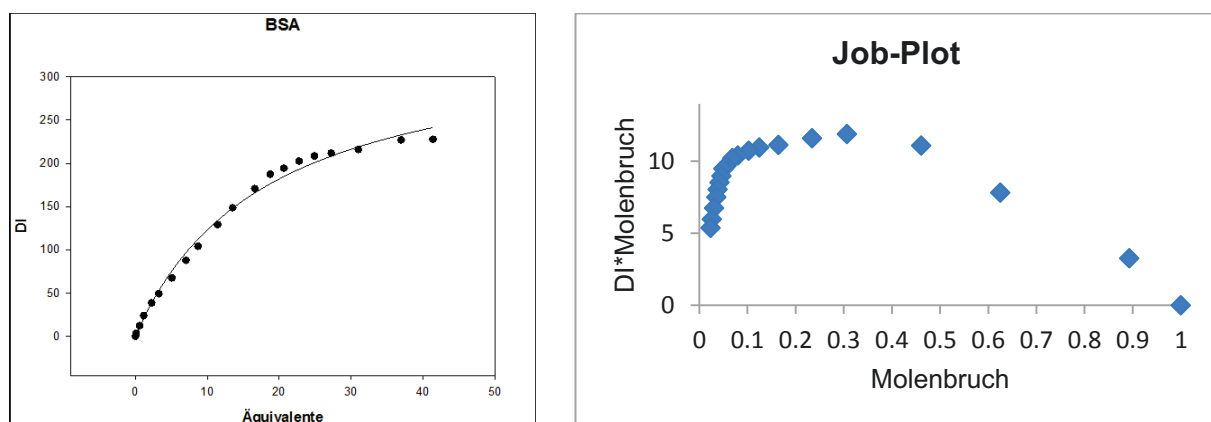
### 5.6.8 Polymer 46 gegen BSA (20 mM NaCl; pH 7.0)

$$K_d (1:1) = 3.25 \cdot 10^{-5} \text{ M } \pm 68\%$$

Stöchiometrie 2.3 : 1 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.43

c (Polymer 46) [mol/L]	c (BSA) [mol/L]	Eq = c1/c2	D I 523 nm	Molenbruch	DI*Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	2,28E-07	0,12	3,66	8,93E-01	3,27E+00
1,90E-06	1,14E-06	0,6	12,52	6,25E-01	7,83E+00
1,90E-06	2,22E-06	1,17	24,05	4,61E-01	1,11E+01
1,90E-06	4,29E-06	2,26	38,76	3,07E-01	1,19E+01
1,90E-06	6,19E-06	3,26	49,39	2,35E-01	1,16E+01
1,90E-06	9,65E-06	5,08	67,66	1,64E-01	1,11E+01
1,90E-06	1,34E-05	7,03	87,88	1,25E-01	1,09E+01
1,90E-06	1,65E-05	8,7	104,19	1,03E-01	1,07E+01
1,90E-06	2,17E-05	11,42	129,24	8,05E-02	1,04E+01
1,90E-06	2,57E-05	13,54	148,6	6,88E-02	1,02E+01
1,90E-06	3,16E-05	16,62	170,71	5,68E-02	9,69E+00
1,90E-06	3,56E-05	18,75	187,46	5,06E-02	9,49E+00
1,90E-06	3,92E-05	20,64	194,32	4,62E-02	8,98E+00
1,90E-06	4,32E-05	22,76	202,65	4,21E-02	8,53E+00
1,90E-06	4,73E-05	24,89	208,43	3,86E-02	8,05E+00
1,90E-06	5,17E-05	27,23	211,78	3,54E-02	7,50E+00
1,90E-06	5,89E-05	30,99	215,97	3,13E-02	6,75E+00
1,90E-06	7,02E-05	36,95	226,954	2,64E-02	5,98E+00
1,90E-06	7,86E-05	41,35	227,75	2,36E-02	5,38E+00

**Tabelle 5.7:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **46** gegen BSA.



**Abb. 5.85:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve von Polymer **46** gegen BSA; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

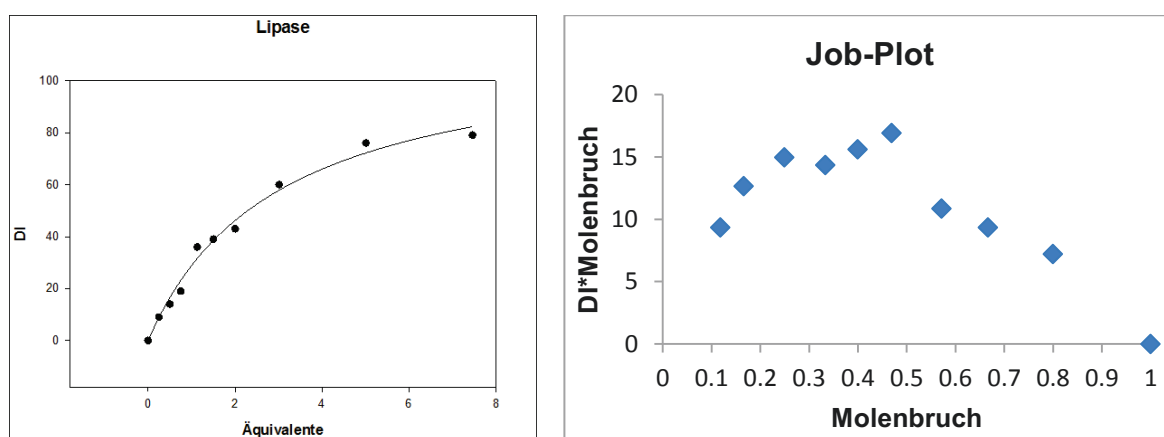
### 5.6.9 Polymer 46 gegen Lipase (20 mM NaCl; pH 7.0)

$$K_d (1:1) = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M } \pm 22\%$$

Stöchiometrie 5 : 1 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.2

c (Polymer 46) [mol/L]	c (Lipase) [mol/L]	Eq = c1/c2	D I 523 nm	Molenbruch	DI*Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	4,75E-07	0,25	9	8,00E-01	7,20E+00
1,90E-06	9,50E-07	0,5	14	6,67E-01	9,33E+00
1,90E-06	1,43E-06	0,75	19	5,71E-01	1,09E+01
1,90E-06	2,15E-06	1,13	36	4,69E-01	1,69E+01
1,90E-06	2,85E-06	1,5	39	4,00E-01	1,56E+01
1,90E-06	3,80E-06	2	43	3,33E-01	1,43E+01
1,90E-06	5,72E-06	3,01	60	2,49E-01	1,50E+01
1,90E-06	9,52E-06	5,01	76	1,66E-01	1,26E+01
1,90E-06	1,42E-05	7,46	79	1,18E-01	9,34E+00

**Tabelle 5.8:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer 46 gegen Lipase.



**Abb. 5.86:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve von Polymer 46 gegen Lipase; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

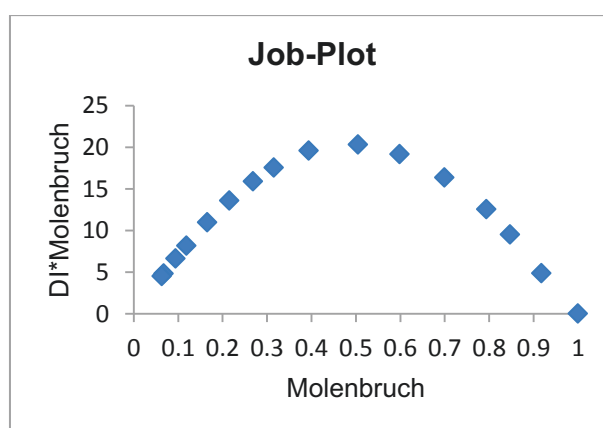
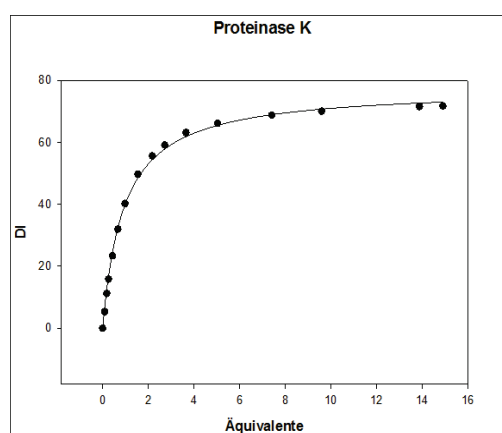
### 5.6.10 Polymer 46 gegen Proteinase K (20 mM NaCl; pH 7.0)

$$K_d (1 : 1) = 8.30 \cdot 10^{-7} \text{ M } \pm 42\%$$

Stöchiometrie 1 : 1.1 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 1.1

c (Polymer 46) [mol/L]	c (Proteinase K) [mol/L]	Eq = c1/c2	DI 523 nm	Molenbruch	DI*Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	1,71E-07	0,09	5,29	9,17E-01	4,85E+00
1,90E-06	3,42E-07	0,18	11,21	8,47E-01	9,50E+00
1,90E-06	4,94E-07	0,26	15,83	7,94E-01	1,26E+01
1,90E-06	8,17E-07	0,43	23,36	6,99E-01	1,63E+01
1,90E-06	1,27E-06	0,67	31,98	5,99E-01	1,91E+01
1,90E-06	1,86E-06	0,98	40,21	5,05E-01	2,03E+01
1,90E-06	2,93E-06	1,54	49,69	3,94E-01	1,96E+01
1,90E-06	4,12E-06	2,17	55,61	3,15E-01	1,75E+01
1,90E-06	5,17E-06	2,72	59,13	2,69E-01	1,59E+01
1,90E-06	6,94E-06	3,65	63,17	2,15E-01	1,36E+01
1,90E-06	9,56E-06	5,03	66,16	1,66E-01	1,10E+01
1,90E-06	1,41E-05	7,41	68,78	1,19E-01	8,18E+00
1,90E-06	1,82E-05	9,59	70,06	9,44E-02	6,62E+00
1,90E-06	2,64E-05	13,87	71,59	6,72E-02	4,81E+00
1,90E-06	2,83E-05	14,9	71,71	6,29E-02	4,51E+00

**Tabelle 5.9:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer **46** gegen Proteinase K.



**Abb. 5.87:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve von Polymer **46** gegen Proteinase K; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.



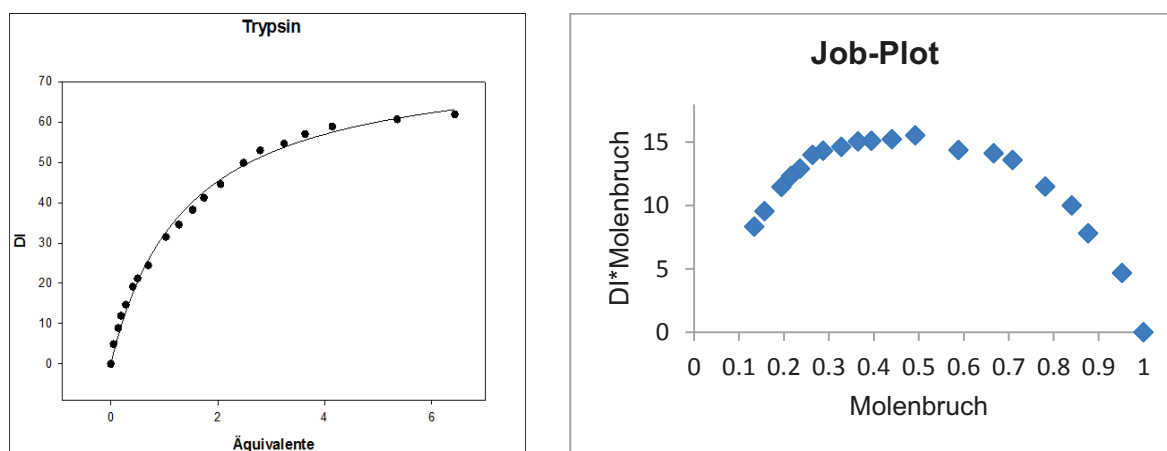
### 5.6.11 Polymer 46 gegen Trypsin (20 mM NaCl; pH 7.0)

$$K_d (1 : 1) = 1.29 \cdot 10^{-6} \text{ M } \pm 18\%$$

Stöchiometrie 1.2 : 1 (Protein/Polymer); Korrekturfaktor 0.83

c (Polymer 46) [mol/L]	c (Trypsin) [mol/L]	Eq = c1/c2	D I 523 nm	Molenbruch	DI*Molenbruch
1,90E-06	0	0	0	1,00E+00	0,00E+00
1,90E-06	9,50E-08	0,05	4,89	9,52E-01	4,66E+00
1,90E-06	2,66E-07	0,14	8,89	8,77E-01	7,80E+00
1,90E-06	3,61E-07	0,19	11,9	8,40E-01	1,00E+01
1,90E-06	5,32E-07	0,28	14,7	7,81E-01	1,15E+01
1,90E-06	7,79E-07	0,41	19,15	7,09E-01	1,36E+01
1,90E-06	9,50E-07	0,5	21,17	6,67E-01	1,41E+01
1,90E-06	1,33E-06	0,7	24,43	5,88E-01	1,44E+01
1,90E-06	1,96E-06	1,03	31,5	4,93E-01	1,55E+01
1,90E-06	2,41E-06	1,27	34,54	4,41E-01	1,52E+01
1,90E-06	2,91E-06	1,53	38,21	3,95E-01	1,51E+01
1,90E-06	3,31E-06	1,74	41,21	3,65E-01	1,50E+01
1,90E-06	3,90E-06	2,05	44,6	3,28E-01	1,46E+01
1,90E-06	4,71E-06	2,48	49,85	2,87E-01	1,43E+01
1,90E-06	5,30E-06	2,79	52,97	2,64E-01	1,40E+01
1,90E-06	6,16E-06	3,24	54,67	2,36E-01	1,29E+01
1,90E-06	6,90E-06	3,63	56,99	2,16E-01	1,23E+01
1,90E-06	7,87E-06	4,14	58,86	1,95E-01	1,15E+01
1,90E-06	1,02E-05	5,35	60,66	1,57E-01	9,55E+00
1,90E-06	1,22E-05	6,43	61,88	1,35E-01	8,33E+00

**Tabelle 5.10:** Ergebnisse der Fluoreszenztitration von Polymer 46 gegen Trypsin.



**Abb. 5.88:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve von Polymer 46 gegen Trypsin; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

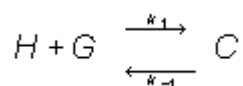
## 5.7 NMR-Titration

Die Vorteile einer NMR-Titration gegenüber einer UV-VIS- oder Fluoreszenzmessung liegen in der geringen Gefahr einer Fehlinterpretation durch mögliche Verunreinigungen. Außerdem besteht die Möglichkeit, zusätzliche Informationen über die Struktur der zu untersuchenden Probe zu erhalten. Für die Auswertung einer NMR-Titration ist es von entscheidender Bedeutung, ob im Vergleich zur NMR-Zeitskala der Austausch zwischen den freien Wirt- und Gastkomponenten bzw. dem entsprechenden Komplex schnell oder langsam erfolgt. Bei einem langsamen Austausch wird je ein Signal für die freie Komponente und für den Komplex erhalten. Die Ermittlung der Komplexbildungskonstanten kann dann direkt über die Integrale der jeweiligen Signale erfolgen. Ein schneller Austausch hat zur Folge, dass nur noch ein gemittelttes Signal beobachtet wird und mit folgender Gleichung:

$$\delta = n_a \delta_a + n_b \delta_b$$

$$\Delta\delta = \delta_a - \delta_b$$

(mit  $n_a$  als Molenbruch und  $\delta_a$  als chemische Verschiebung der Spezies A) wiedergegeben werden kann. Für Komplexierungsreaktionen kann nach dem Aufstellen des Massenwirkungsgesetzes der Molenbruch für den Komplex ( $n_c$ ) wie folgt beschrieben werden. Betrachtet wird eine Komplexbildung zwischen einem Wirt (H) und einem Gast (G):



Als Maß für die Stärke des Komplexes wird die Gleichgewichtskonstante K bestimmt mit:

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[C]}{[H][G]} = \frac{n_c}{n_h[G]} = \frac{n_c}{(1-n_c)[G]}$$

Im Falle eines langsamen Austausches folgt für K:

$$K = \frac{n_c / [H_0]}{(1-n_c)(R-n_c)}$$

mit:

$$R = \frac{[G_0]}{[H_0]}$$

Für einen schnellen Austausch ergibt sich für den Molenbruch des Komplexes ( $n_c$ ) folgender Ausdruck:

$$n_c = \frac{\delta_h - \delta}{\delta_h - \delta_c}$$

(mit  $\delta$  als beobachtete chemische Verschiebung und entsprechend  $\delta_h$  des Wirtes und  $\delta_c$  des Komplexes).

Die beobachtete chemische Verschiebung ist eine Funktion der Konzentration von Wirt und Gast, der chemischen Verschiebung des reinen Wirtes als bekannte Größe sowie von der chemischen Verschiebung des reinen Komplexes und der Gleichgewichtskonstanten als unbekannte Größen. Als Lösung einer resultierenden quadratischen Gleichung erhält man eine Gleichung mit zwei Unbekannten:

$$\delta = \delta_h - \left(\frac{\Delta\delta}{2}\right)(b - \sqrt{b^2 - 4R})$$

mit

$$b = 1 + R + \frac{1}{(K[H_0])}$$

( $R$  gibt das Verhältnis von Wirt zu Gast an). Die beobachtete chemische Verschiebung  $\delta$  wird als complexation induced shift (CIS) bezeichnet. In einer NMR-Titration wird das Verhältnis  $R$  der Komponenten, die den Komplex bilden, variiert und der daraus resultierende CIS gemessen. Die Auswertung und Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgt daher durch nichtlineare Regression unter der Annahme eines 1:1 Komplexes. Benutzt wurde ein Programmpaket von SigmaPlot®.<sup>[110]</sup>

### 5.7.1 Praktische Durchführung

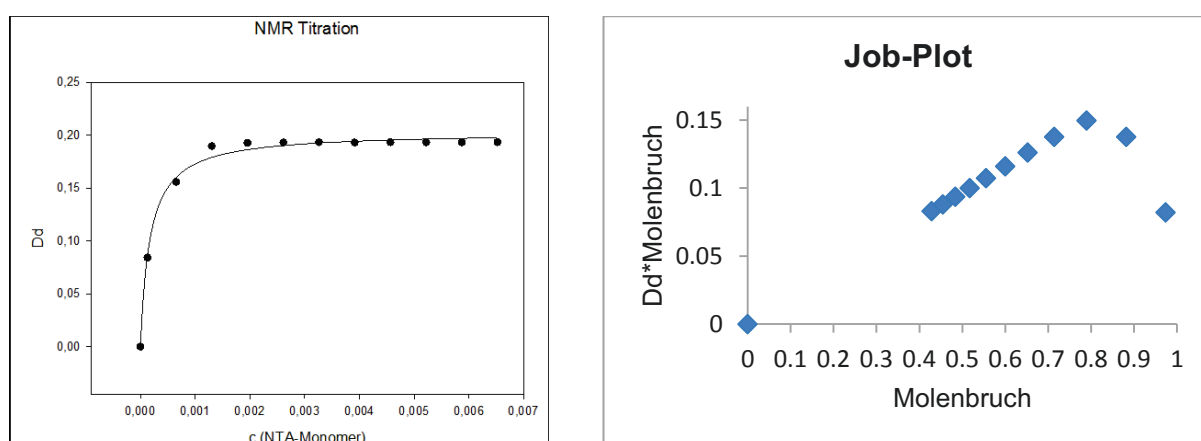
Die Wirtlösung wurde vorgelegt und die Gastlösung (Der Gast wird in einem Teil der Wirtlösung gelöst) wurde sukzessive zutitriert, bis mindestens 5 Äquivalente Gast zugefügt worden sind. Diese Methode ist sehr einfach und erfordert nur minimalste Stoffmengen. Nachteile sind ein relativ hoher Zeitaufwand, weil durch die periodisch notwendigen Titrationsschritte nicht in Automation gemessen werden kann.

$$K_d (1:1) = 3.8 \cdot 10^{-6} \text{ M } \pm 9\%$$

Stöchiometrie 3.7:1 (Gast: Lysin/Wirt: NTA-Monomer); Korrekturfaktor 0.27

c(G) [mol/l]	c(W) [mol/l]	$\Delta\delta(\text{G})$	Molenbruch	$\Delta\delta(\text{G}) \cdot \text{Molenbruch}$
4,90E-03	6,52E-03	0,1933	4,29E-01	8,29E-02
4,90E-03	5,87E-03	0,1932	4,55E-01	8,79E-02
4,90E-03	5,22E-03	0,1932	4,84E-01	9,36E-02
4,90E-03	4,56E-03	0,1933	5,18E-01	1,00E-01
4,90E-03	3,91E-03	0,193	5,56E-01	1,07E-01
4,90E-03	3,26E-03	0,1933	6,00E-01	1,16E-01
4,90E-03	2,61E-03	0,1931	6,53E-01	1,26E-01
4,90E-03	1,96E-03	0,1927	7,15E-01	1,38E-01
4,90E-03	1,30E-03	0,1896	7,90E-01	1,50E-01
4,90E-03	6,52E-04	0,1559	8,83E-01	1,38E-01
4,90E-03	1,30E-04	0,0843	9,74E-01	8,21E-02
4,90E-03	0	0	0	0,00E+00

**Tabelle 5.10:** Ergebnisse der NMR-Titration von NTA-Monomer gegen Ac-Lys-OMe in DMSO-d<sub>6</sub> bei pH 7.0.



**Abb. 5.88:** links: graphische Darstellung der Bindungskurve; rechts: Job-Plot ohne Korrekturfaktor.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIBN	Azoisobutyronitril
Ala (A)	Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
Anti-IL8	Anti Interleukin 8
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure / Aspartat
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BP	Bisphosphonat-Monomer
BSA	Bovine serum albumin
CBS	Carboxylatbindungsstelle
CD	β-Cyclodextrin-Monomer
CDR	complementarity determining region
Cys (C)	Cystein
CytC	Cytochrom C
Da	Dalton
DADPA	Diaminodipropylamin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan

DMAP	4- <i>N,N'</i> -Dimethylamonipyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
eq	Äquivalent
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
Fab	antigen-binding Fragment
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fc	crystallizable Fragment
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FR	framework region
gef.	gefunden
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure / Glutamat
Gly (G)	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxid hexafluorophosphat
HIC	hydrophobe Interaktionchromatographie
His (H)	Histidin
HRMS	hochaufgelöste (high resolution) Massenspektrometrie

---

HRP	horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
Ile (I)	Isoleucin
kDa	Kilo-Dalton
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
mAb	monoclonal Antibody
MAC	membrane attack complex
MASP	<i>MBL-associated serine proteases</i>
MBL	mannosebindendes Lektin
MD	Molecular Modelling
MES	2-[ <i>N</i> -Morpholino]- ethansulfonsäure
Met (M)	Methionin
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMWL	Nominal Molekular Weight Limit
NTA	Nitrilotriacetat
PAC	Poly(acrylat)
PBS	Phosphate buffered saline
10% Pd/C	10% Palladium auf Aktivkohle
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Poly(ethylenglycol)

---

Phe (F)	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
ppm	parts per million
Pro (P)	Prolin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
Ser (S)	Serin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr (T)	Threonin
THF	Tetrahydrofuran
TMSO	Trimethylsilyltriflat
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosin
Val (V)	Valin
vgl.	vergleiche
Z	Benzyloxycarbonyl
z.B.	zum Beispiel



## 7 Literaturverzeichnis

- [1] E. Brechner, B. Dinkelaker, D. Dreesmann, *Online-Kompaktlexikon der Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.
- [2] A. Yarnell, *C&EN*, **2004**, 41, 45.
- [3] Patent: *Human mu opiod receptor*, EP0797661 A1 vom 01.10.1997.
- [4] S. Clemens, Lehrstuhl Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth, *Skript zur Vorlesung Allgemeine Pflanzenwissenschaften I*, **WS07/08**.
- [5] G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich, *Biochemie & Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**.
- [6] P. Deetjen, E.-J. Speckmann, J. Hescheler, *Physiologie*, 4. Vollständig überarbeitete Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, **2005**.
- [7] Annemarie Honegger, *A's amazing Atlas of Antibody Anatomy*, bioc. uzh. ch.
- [8] O. Bohana-Kashtan, L. Ziporen, N. Donin, S. Kraus, Z. Fishelson, *Molecular Immunology*, **2004**, 41, 583-597.
- [9] B. Cummings, *Human Anatomy & Physiology*, 5. Auflage, San Francisco, **2001**.
- [10] B. Schäfer, *GK2 Immunologie und Immunopathologie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2001**.
- [11] H.W. Schroeder Jr., L. Cavacini, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **2010**, 125, 41-52.
- [12] R.G. Hamilton, *Clin. Chem.*, **1987**, 33, 1707-1725.
- [13] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin, **2002**.
- [14] S.J. Searle, J.T. Pedersen, A.H. Henry, D.M. Webster, A.R. Rees, *Antibody structure and function*, In: C.A. Borrebaeck, *Antibody Engineering*. Oxford University Press Inc., New York, **1995**.
- [15] R.P. Rother, S.A. Rollins, C.F. Mojcik, R.A. Brodsky, L. Bell, *Nature Biotechnology*, **2007**, 25(11), 1256-1264.
- [16] A.H. Lucas, *Springer Semin. Immunopathol.*, **1990**, 12, 385-400.
- [17] J. Wypych, M. Li, A. Guo, Z. Zhang, T. Martinez, M.J. Allen, S. Fodor, D.N. Kelner, G.C. Flynn, Y.D. Liu *et al.*, *Blood*, **2009**, 113, 3716-3725.
- [18] S. Lechowski, *Dissertation*, Universität Hohenheim, **2011**.
- [19] L.J. Harris, S.B. Larson, K.W. Hasel, A. McPherson, *Biochemistry*, **1997**, 36, 1581-1597.
- [20] W.P. Burmeister, A.H. Huber, P.J. Bjorkman, *Nature*, **1994**, 372, 379-383.
- [21] W.L. Martin, A.P. West Jr., L. Gan, P.L. Bjorkman, *Mol. Cell*, **2001**, 7, 867-877.

- [22] A.E. Sauer-Eriksson, G.J. Kleywegt, M. Uhlen, T.A. Jones, *Structure*, **1995**, 3, 265-278.
- [23] J.P. Derrick, D.B. Wigley, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 243, 906-918.
- [24] J.P. Derrick, I.M. Feavers, M.C.J. Maiden, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 81.
- [25] J. Deisenhofer, *Biochemistry*, **1981**, 20, 2361-2370.
- [26] M. Graille, E.A. Stura, A.L. Coper, B.J. Sutton, M.J. Taussig, J.B. Charbonnier, G.J. Silverman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 5399-5404.
- [27] M. Graille, E.A. Stura, N.G. Hourden, J.A. Beckinham, S.P. Bottomley, D. Beale, M.J. Taussig, B.J. Sutton, M. G. Gore, J.B. Charbonnier, *Structure*, **2001**, 9, 679.
- [28] K. Willson, *J. Immunochemical techniques*, Cambridge University Press, NY, **2006**, 820.
- [29] G. Köhler, C. Milstein, *Nature*, **1975**, 256, 495-497.
- [30] M.J. Pelczar, E.C.S. Chan, N.R. Krieg, *Microbiology*, **2005**, 32, 730.
- [31] B.R. Glick, J.J. Pasternak, *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*, University of Waterloo, Ontario, Canada, **1998**, 201-250.
- [32] S.B. Bumrela, B.S. Kuchekar, R.J. Dias, R.N. Kane, K. Patel, *Pharmarceutical Information*, **2007**, 5(6).
- [33] G.L. Boulianne, N. Hozumi, M.J. Shulman, *Nature*, **1984**, 312, 643-646.
- [34] M. Verhoeyen, L. Riechmann, *Bioassays*, **1988**, 8(2), 74-78.
- [35] P.A. Heiter, E.E. Max, J.G. Seidmann, J.V. Meizel, P. Leder, *Cell*, **1980**, 22, 197-207.
- [36] R.G. Hawley, M.J. Shulman, H. Murialdo, D.M. Gibson, N. Hozumi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79(23), 7425-7429.
- [37] G. Winter, W.J. Haris, *Immunol. Today*, **1993**, 14(6), 243-246.
- [38] I. Berkower, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1996**, 7(6), 622-628.
- [39] P.T. Jones, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, *Nature*, **1986**, 321, 522-525.
- [40] M.S. Co, N.M. Avdalovic, P.C. Caron, M.V. Avdalovic, D.A. Scheinberg, C. Queen, *J. Immunol.*, **1992**, 148(4), 1149-1154.
- [41] D. Gussow, G. Seemann, *Methods Enzymol.*, **1991**, 203, 99-121.
- [42] J.D. Isaacs, R.A. Watts, B.L. Hazleman, G. Hale, M.T. Keogan, S.P. Cobbold, H. Waldmann, *Lancet*, **1992**, 340, 748-752.
- [43] V. Kyle, J. Roddy, G. Hale, B.L. Hazleman, H. Waldmann, *J. Rheumatol.*, **1991**, 18(11), 1737-1738.

- [44] G. Taylor, J. Furze, P.R. Tempest, P. Brenner, F.J. Carr, W.J. Harris, *Lancet*, **1991**, 337, 1411-1412.
- [45] P.W. Mathieson, S.P. Cobbold, G. Hale, M.R. Clark, D.B. Oliveira, C.M. Lockwood, H. Waldmann, *N. Engl. J. Med.*, **1990**, 323(4), 250-254.
- [46] 19. Vyas SP & Dixit VP., *Pharmaceutical biotechnology*, CBS Publishers & Distributor, New Delhi **1998**, 489-500.
- [47] K.J. Reis, E.M. Ayoub, M.D. Boyle, *J. Immunol. Methods*, **1983**, 59(1), 83-94.
- [48] A.A. Shukla, J. Thömmes, *Trends in Biotechnology*, **2010**, 28(5), 253-261.
- [49] D. Burke, *Basic HPLC and CE of Biomolecules*, Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond, California, **1998**, 223.
- [50] P. Fuglistaller, *J. Immunol. Methods*, **1989**, 124(2), 171-177.
- [51] M.A.J. Godfrey, P. Kwasowski, R. Clift, V. Marks, *J. Immunol. Methods*, **1992**, 149(1), 21-27.
- [52] Lain et al, *Bioprocess International*, **2009**, 7(5), 26-34.
- [53] H. Neye, *Pharmazeutische Zeitung online*, Govi-Verlag, 43. Ausgabe, **2006**.
- [54] S. Ahuja (Ed.), *handbook of Bioseparations in Separation Science and Technology*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, San Diego, CA, **2000**.
- [55] E. Grund, *Advances in downstream processing. Presented at Scaling up of Biopharmaceutical Proteins*, IBC Life Sciences, Basel, January 23., **2003**.
- [56] U. Gottschalk, "Downstream Processing of Monoclonal Antibodies: from High Dilution to High Purity", BioPharm International, **2005**.
- [57] Patent: *Neue Dendrimere und Polymere zur Proteinreinigung*, DE 10 2005 059 379.8 vom 9.12.2005.
- [58] E.E. Idusogie, L.G. Presta, H. Gazzano-Santoro, K. Totpal, P.Y. Wong, M. Ultsch, Y.G. Meng, M.G. Mulkerrin, *J. Immunol.*, **2000**, 164, 4178-4184.
- [59] L. Warren DeLano, *et al.*, *Science*, **2000**, 287, 1279-1283.
- [60] T. Moks, L. Abrahmsen, B. Nilsson, U. Hellman, J. Sjöquist, M. Uhlen, *Eur. J. Biochem.*, **1986**, 156(3), 637-643.
- [61] *Proteins*, **2004**, 55, 407-416.
- [62] R. Li, V. Dowd, D.J. Stewart, S.J. Burton, C.R. Lowe, *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16, 190-195.
- [63] *Biochemistry*, **1990**, 29, 278-285.
- [64] Fassina, *et al.*, *Journal of Molecular Recognition*, **1996**, 9, 564-569.
- [65] C. Renner, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.

- [66] A. Contento, „*Laboratory Exercises and Techniques in Cellular Biology*“, Wiley-VCH Verlag, **2013**.
- [67] Suxia Zhang et al., *Anal. Methods*, **2012**, 4, 2151-2155.
- [68] S. Leng, J. McElhaney, J. Walston, D. Xie, N. Fedarko, G. Kuchel, *J Gerontol a Biol Sci Med Sci*, **2008**, 63 (8), 879-884.
- [69] Y. Cheng, W.H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.*, **1973**, 22, 3099-3108.
- [70] D. Rodbard, J.E. Leward, *Steroid assay by protein binding*. E. Diczfausy (ed.), Karolinska Institute, Stockholm, **1970**, 79-103.
- [71] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules*, **2002**, 35, 6192 - 6201.
- [72] S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 5814.
- [73] T. Grawe, G. Schäfer, T. Schrader, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 1641.
- [74] D. E. Koshland, *Angew. Chem.*, **1994**, 106, 2468 - 2412.
- [75] Z. Grabarek, J. Gergly, *Anal. Biochem.*, **1990**, 185, 131-135.
- [76] M. A. Gilles et al., *Anal. Biochem.*, **1990**, 184, 244.
- [77] A. Williams, I. A. Ibrahim, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 7090-7095.
- [78] J. V. Staros et al., *Anal. Biochem.*, **1986**, 156, 220-222.
- [79] A. J. Lomant, G. Fairbanks, *J. Mol. Biol.*, **1976**, 104, 243-261.
- [80] P. Cuatrecasas, I. Parikh, *Biochemistry*, **1972**, 11, 291-299.
- [81] G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 803.
- [82] K. J. Shea et al., *Journal of the American Chemical Society*, **2012**, 134, 15765-15772.
- [83] C. Renner, *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**.
- [84] S. Koch, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [85] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 22. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.
- [86] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3<sup>rd</sup> ed., Pergamon Press, New York, **1988**.
- [87] S. Ebel und H. J. Roth, *Lexikon der Pharmazie*, Georg Thieme Verlag, **1987**.
- [88] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.

- [89] T. Reschel, C. Konak, d. Oupicky, L. W. Seymour, K. Ulbrich, *Journal of controlled Release* **2002**, *81*, 201-217.
- [90] M. Pecs, M. Eggert, K. Schügerl, *Journal of Biotechnology*, **1991**, *21*, 137 - 142.
- [91] C. Rensing et al., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5814-5821.
- [92] C. Renner et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 620-628.
- [93] A. Ellwagner, C. Berggren, S. Bayoudh, C. Crecenzi, L. Karlsson, P. K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington, B. Sellergren, *Analyst* **2001**, *126*, 784-792.
- [94] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules* **2002**, *35*, 6192-6201.
- [95] C. A. Wartchow, P. Wang, M. D. Bednarski, M. R. Callstrom, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2216 - 2226.
- [96] K. M. Shea, R. L. Danheiser, *Organic Synthesis*, **2004**, *10*, 686.
- [97] R. Li, V. Dowd, D. J. Stewart, S. J. Burton, C. R. Lowe, *Nature Biotechnology*, **1998**, *16*, 190 – 195.
- [98] E. L. Doyle, C. A. Hunter, H. C. Phillips, S. J. Webb, N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4593-4599.
- [99] W. Sun, in *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **2009**.
- [100] K. Wenck, in *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **2010**.
- [101] G. Ogden, P. Foldi, *LC-GC*, **1987**, *5(1)*, 28-38.
- [102] M. Roth, *Anal. Chem.*, **1971**, *43*, 880-882.
- [103] J. M. Dixon, M. Taniguchi and J. S. Lindsey, "PhotochemCAD 2. A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations", *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 212-213.
- [104] Y. Cheng and W.H. Prusoff, "Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which cause 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction.", *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [105] D. Rodbard and J.E. in *Steroid Assay by Protein Binding*. **1970**, 79-103, E. Diczfausy (ed.), Karolinska Institute, Stockholm.
- [106] P. Job, *Compt. Rend.* **1925**, *180*, 928-930.
- [107] C. Y. Huang, *Methods in Enzymology* **1982**, *87*, 509.
- [108] H. J. Schneider, R. Kramer, S. Simova, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6442.
- [109] C. S. Wilcox, *Frontiers in Supramolecular Chemistry*, Verlag Chemie, Weinheim, **1991**.
- [110] V. Wendel, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin*, **1998**.



# **Curriculum vitae**

## **Persönliches**

Name: Patricia Latza

## **Akademischer Werdegang**

- 10/2009 – 09/2013  
Promotion am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. T. Schrader im Rahmen des BMBF Forschungsprojekts „Antikörper-Selektive Materialien zum Downstream Processing“  
Thema der Dissertation: „Antikörper-Selektive Polymere zur Reinigung von medizinischem Immunglobulin G“  
Tag der Disputation: 13.09.2013
- 12/2008 – 06/2009  
Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. C. Schmuck zum Thema „Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter Cysteinproteaseinhibitoren“.
- 10/2004 – 06/2009  
Studium der Chemie an der Universität Duisburg-Essen mit Spezialisierung auf Medizinisch-Biologische Chemie im Hauptstudium

## **Schulische Ausbildung**

- 09/2003 – 08/2004  
MTA-Schule am Universitätsklinikum Essen, abgebrochen wegen Studium
- 08/1994 – 06/2003  
Besuch des Ratsgymnasiums in Gladbeck und Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife